

UNIVERSITÉ DE MONTRÉAL

**Le rôle de l'exercice physique dans le développement de la résistance hépatique
au glucagon résultant de la stéatose hépatique non-alcoolique**

Par
Alexandre Charbonneau

Département de kinésiologie

Thèse présentée à la Faculté des études supérieures en vue de l'obtention du grade
de Philosophiae Doctor (Ph.D.) en physiologie de l'exercice

Décembre 2005



Copyright, Alexandre Charbonneau, 2005

GV

201

U54

2006

U.006

AVIS

L'auteur a autorisé l'Université de Montréal à reproduire et diffuser, en totalité ou en partie, par quelque moyen que ce soit et sur quelque support que ce soit, et exclusivement à des fins non lucratives d'enseignement et de recherche, des copies de ce mémoire ou de cette thèse.

L'auteur et les coauteurs le cas échéant conservent la propriété du droit d'auteur et des droits moraux qui protègent ce document. Ni la thèse ou le mémoire, ni des extraits substantiels de ce document, ne doivent être imprimés ou autrement reproduits sans l'autorisation de l'auteur.

Afin de se conformer à la Loi canadienne sur la protection des renseignements personnels, quelques formulaires secondaires, coordonnées ou signatures intégrées au texte ont pu être enlevés de ce document. Bien que cela ait pu affecter la pagination, il n'y a aucun contenu manquant.

NOTICE

The author of this thesis or dissertation has granted a nonexclusive license allowing Université de Montréal to reproduce and publish the document, in part or in whole, and in any format, solely for noncommercial educational and research purposes.

The author and co-authors if applicable retain copyright ownership and moral rights in this document. Neither the whole thesis or dissertation, nor substantial extracts from it, may be printed or otherwise reproduced without the author's permission.

In compliance with the Canadian Privacy Act some supporting forms, contact information or signatures may have been removed from the document. While this may affect the document page count, it does not represent any loss of content from the document.

UNIVERSITÉ DE MONTRÉAL
Faculté des études supérieures

Cette thèse intitulée :

**Le rôle de l'exercice physique dans le développement de la résistance hépatique
au glucagon résultant de la stéatose hépatique non-alcoolique**

présentée par

Alexandre Charbonneau
Département de kinésiologie

a été évaluée par un jury composé des personnes suivantes :

Louise Béliveau
président-rapporteur

Jean-Marc Lavoie
directeur de recherche

François Péronnet
membre du jury

Denis Prud'Homme
examineur externe

Jean-Louis Chiasson
représentant du doyen de la FES

SOMMAIRE

En plus d'être considéré comme un des plus gros organes chez les mammifères, le foie est la glande la plus volumineuse de l'organisme. Cet organe multifonctionnel a une structure presque identique dans divers groupes taxonomiques ce qui explique le peu de différences inter espèces chez les mammifères.

Parmi ses multiples fonctions, le foie est responsable du maintien de la glycémie : le foie absorbe et emmagasine le glucose circulant en excès sous une forme polymérique, le glycogène. Au besoin, ce polymère peut être dégradé en glucose par l'action du glucagon pour fournir de l'énergie. Lors d'un jeûne ou d'un effort physique prolongé, le glucagon favorise la création de glucose à partir d'acides aminés gluconéogéniques, du lactate et du glycérol. Le foie peut aussi entreposer des lipides : par exemple, après un repas riche en lipides, les hépatocytes accumulent des triglycérides. À long terme, une consommation d'aliments riches en gras favorise le développement d'un « foie gras ». Cette dégénérescence du foie est l'un des premiers signes de l'apparition d'une pathologie hépatique. Si cette pratique alimentaire persiste pendant plusieurs années, des pathologies comme la stéatose hépatique non-alcoolique (SHNA), la cirrhose du foie et le diabète de type 2 peuvent se développer.

Lors de notre première étude, nous avons étudié les effets d'une SHNA induite par une diète riche en lipides sur la sensibilité hépatique au glucagon. Les résultats expérimentaux montrent une diminution de la production hépatique de glucose (PHG) lors d'un clamp hyperglucagonémique. De plus, lorsque les données individuelles de PHG sont comparées aux concentrations de triglycérides hépatiques, une relation négative est observée entre l'augmentation de lipides hépatiques et la perte de sensibilité du foie au glucagon. En utilisant un protocole d'entraînement en endurance de 6 semaines, nous avons augmenté la sensibilité du foie au glucagon. Cette étude est la première à montrer qu'une résistance hépatique au glucagon se développe suite à l'ingestion d'une diète riche en lipides et que l'entraînement en endurance peut atténuer cette perte de sensibilité. Nous suggérons qu'une infiltration hépatique de lipides peut être responsable du développement de la résistance hépatique au glucagon.

Pour comprendre les résultats précédents, notre seconde étude avait pour but d'examiner la densité et l'affinité des récepteurs hépatiques au glucagon (RG) en plus de déterminer le contenu membranaire des hépatocytes en protéines G d'animaux nourris à une diète riche en lipides. Une diminution significative de la densité des RG (sans modification de son l'affinité) et du contenu membranaire en protéines $G_{s\alpha}$ a été observée simultanément à une augmentation en protéines $G_{i\alpha 2}$. Nos résultats suggèrent que l'infiltration hépatique de lipides réduit la sensibilité du foie au glucagon en diminuant la densité des RG et l'efficacité du système de signalisation intra-cellulaire du glucagon.

La diminution du nombre de RG dans notre seconde étude nous motive à examiner la désensibilisation et l'internalisation des RG lors d'une SHNA ainsi qu'à expliquer comment une session d'exercice en endurance peut moduler ce processus cellulaire. Une réduction significative du nombre total de RG présents dans les hépatocytes ainsi qu'une diminution des récepteurs membranaires ont été mesurées. Ces changements sont accompagnés d'une augmentation des RG au niveau des endosomes et des lysosomes. Bien que l'exercice en endurance module la présence de RG membranaires, ses effets sont limités sur le nombre de RG totaux et lysosomaux. Dans l'ensemble, nos résultats suggèrent que la diminution de la sensibilité du foie au glucagon lors d'une SHNA peut s'expliquer par une réduction du nombre de RG totaux et membranaires.

Globalement, nos études sur la sensibilité hépatique au glucagon lors d'une SHNA offrent une perspective nouvelle sur les effets délétères associés à une infiltration hépatique de lipides. Bien que de plus amples études sont nécessaires pour comprendre les mécanismes moléculaires modulant l'expression des RG dans notre modèle animal de SHNA, nous croyons que nos résultats permettent de mieux comprendre les effets d'une SHNA sur le métabolisme du glucagon.

SUMMARY

The liver is one of the largest organs in mammals, and is the largest gland by a considerable margin. It's a remarkable gland with numerous functions, and its structure in many different taxonomic groups is virtually identical; species differences, especially within mammals, are minor.

The liver has, as one of its many functions, the responsibility for maintaining blood glucose levels. To this end, the hepatocytes take up and store excess glucose as a polymeric derivative, glycogen. Glycogen can, when needed, be dismantled back into its constituent glucose moieties by the action of glucagon, the hyperglycemic pancreatic hormone. Following glucagon stimulation in fasting and exercise, the liver can also produce glucose from gluconeogenic amino acids. Hepatocytes are also a temporary storage depot for lipids. After eating a lipid rich meal, the liver can become gorged with fat droplets in the hepatocytes. The practice of chronic overindulgence in fatty food could result in the development of fatty liver. This "fatty degeneration" is one of the first indications of liver disease. If the gorging continues for years, non-alcoholic hepatic-steatosis (NASH), cirrhosis and type 2 diabetes can occur.

In our first study, we examined the effects of a NASH induced by a high fat diet on hepatic glucagon sensitivity. Results showed a significant reduction in hepatic glucose production following a hyperglucagonemic clamp. Comparisons of all individual liver triglyceride and hepatic glucose production values revealed that liver triglyceride values were highly predictive of the decreased glucagon hepatic glucagon sensitivity. Using a 6 weeks endurance training protocol, we were able to significantly increase the liver sensitivity to glucagon. This study was the first to present results indicating that the feeding of a high-fat diet induces a state of hepatic glucagon resistance, which can be partially attenuated by concurrent endurance training. We suggested that liver lipid infiltration might interfere with the action of glucagon, thus inducing glucagon resistance in liver.

In our second study, we examined glucagon receptor (GR) density and affinity as well as hepatic plasma membrane G protein content of high fat fed animals to see if alterations in those parameters could explain the reduction in

hepatic glucagon sensitivity seen in our first study. The high-fat diet resulted in significantly lower hepatic GR density and Gs_{α} protein content as well as higher $Gi_{\alpha 2}$ protein content with no significant effects on GR affinity. We suggested that liver lipid infiltration plays a role in reducing glucagon action in the liver of high fat fed rats through a reduction in GR density and glucagon-mediated signal transduction.

Finally, the reduction of GR number in our second study prompted us to examine if NASH increases hepatic GR desensitization and internalization and whether an acute bout of endurance exercise could favorably affect those cellular mechanisms. Steatotic rats showed a reduction of total hepatic GR and hepatic plasma membrane GR protein content. These changes were accompanied by a significant increase in endosomal and lysosomal GR content with the feeding of a high fat diet. An acute bout of endurance exercise had limited effects on total cellular and lysosomal GR content but seems to regulate GR content on plasma membranes. Again, to add to our previous findings, the reduced glucagon action in the liver seen in non-alcoholic hepatic steatotic rats could be explained by a reduction in total cellular and plasma membrane GR content.

In summary, our studies on hepatic glucagon sensitivity in NASH helped shed light on the deleterious effects associated with physiopathologies exhibiting an increased liver lipid infiltration. Although further studies are required to understand the molecular mechanisms that regulate the changes we documented on hepatic GR in our animal model of NASH, we believe that our findings are helpful to further understanding the glucagon metabolism in physiopathologies such as NASH.

Mots clés

Glucagon

Récepteurs au glucagon (RG)

Récepteurs couplés aux protéines G (RCPG)

Stéatose hépatique non-alcoolique (SHNA)

Production hépatique de glucose (PHG)

Densité des récepteurs (Bmax)

Affinité des récepteurs (Kd)

Désensibilisation

Internalisation

Entraînement et exercice en endurance

Keywords

Glucagon

Glucagon receptor (RG)

G-protein coupled receptors (GPCR)

Non-alcoholic hepatic steatosis (NASH)

Hepatic glucose production (HGP)

Receptor density (Bmax)

Receptor affinity (Kd)

Desensitization

Internalization

Aerobic training and exercise

Table des matières

Page Titre	p. i
Évaluation des pairs	p. ii
Sommaire	p. iii
Summary	p. vi
Key words	p. ix
Mots Clés	p. ix
Liste des tableaux	p. xiii
Liste des figures	p. xiv
Liste des abréviations	p. xvii
Dédicace	p. xx
Les remerciements	p. xxi
Chapitre 1 : Le glucagon	p. 23
1.1. Introduction	p. 24
1.2. Le glucagon : régulateur de l'homéostasie glucidique <i>in vivo</i>	p. 27
1.3. La régulation du métabolisme du glucose par le glucagon	p. 30
1.3.1. Activation de la glycolyse	p. 30
1.3.2. Activation de la gluconéogenèse	p. 32
1.3.3. Inhibition de la glycogénèse	p. 33
1.3.4. Inhibition de la glycolyse	p. 34
1.4. Le récepteur au glucagon	p. 35
1.5. La désensibilisation du récepteur au glucagon	p. 40
1.5.1. La désensibilisation homologue	p. 41
1.5.2. La désensibilisation hétérologue	p. 43
1.5.3. Le devenir des RCPG endocytés	p. 44
1.6. Le rôle du glucagon lors de l'exercice et de l'entraînement en endurance	p. 46
1.6.1. Le récepteur au glucagon et l'entraînement en endurance	p. 48

1.7. Facteurs responsables des modifications du récepteur au glucagon	p. 50
1.8. Contrôle de l'expression du récepteur au glucagon	p. 52
1.9. Le glucagon et son récepteur dans diverses pathologies	p. 54
1.9.1. Le diabète	p. 54
1.9.2. La stéatose hépatique non-alcoolique	p. 56
1.9.2.1. Pathogenèse	p. 56
1.9.2.2. La résistance à l'insuline dans le développement de la stéatose hépatique non-alcoolique	p. 57
1.9.2.3. Adipocytokines et stéatose hépatique non-alcoolique	p. 60
1.9.2.4. La stéatose hépatique non-alcoolique et le glucagon	p. 61
1.10. La stéatose hépatique et l'exercice	p. 63
Chapitre 2 : Présentation de la thèse	p. 65
2.1. Objectifs de la thèse	p. 66
2.2. Introduction aux manuscrits	p. 67
Étude 1	p. 67
Étude 2	p. 69
Étude 3	p. 71
Chapitre 3	p.73
Manuscrit 1 : Evidence of Hepatic Glucagon Resistance Associated with Hepatic Steatosis : Reversal Effect of Training	
Chapitre 4	p. 103
Manuscrit 2 : Alterations in Hepatic Glucagon Receptor Density, and in $G_{s\alpha}$ and $G_{i\alpha 2}$ Protein Content with Diet-Induced Hepatic Steatosis: Effects of Acute Exercise	
Chapitre 5	p. 134
Manuscrit 3 : Hepatic Glucagon Receptor Internalization Associated with Diet-Induced Hepatic Steatosis.	
Chapitre 6 : Discussion de la thèse	p. 166
6.1. Discussion et considérations de la première étude	p. 167
6.1.1. Production hépatique de glucose	p. 167

6.2. Discussion et considérations de la deuxième et troisième étude	p. 172
6.2.1. Résultats de la seconde étude	p. 172
6.2.2. Modification du contenu membranaire en protéines $G_{s\alpha}$ et $G_{i_{\alpha 2}}$	p. 172
6.2.3. Résultats de la troisième étude	p. 177
6.2.4. Mécanisme alternatif à la désensibilisation et l'internalisation des récepteurs hépatiques au glucagon	p. 178
6.3. Modèle hypothétique d'induction de la résistance hépatique au glucagon lors d'une stéatose hépatique induite par une diète riche en lipides	p. 181
6.4. L'impact de l'entraînement et de l'exercice en endurance sur la résistance hépatique au glucagon	p. 183
Chapitre 7 : Conclusions et perspectives	p. 186
Références	p. 186
Appendice 1 : Résumé d'articles en tant que co-auteurs	p. 217
Appendice 2 : Résumé des présentations à des congrès internationaux	p. 219

Liste des tableaux

Tableau 1 : Effets principaux du glucagon

p. 27

Liste des figures

- Figure 1 page 34
Régulation du métabolisme du glycogène hépatique par le glucagon. Schématisation des effets du glucagon sur la glycogénolyse et la glycogénèse
- Figure 2 page 35
Régulation du métabolisme hépatique du glucose par le glucagon. FBPase-2 : fructose-2,6-biphosphatase; PFK2 : 6-phosphofructo-2-kinase; PEPCCK : phophoénolpyruvate carboxykinase. Les détails des effets du glucagon sur ces métabolismes sont décrits dans le texte
- Figure 3 page 38
Récepteur à sept domaines transmembranaires. NH₂ : Extrémité amino-terminale; COOH : Extrémité carboxyle-terminale; TM : Domaine transmembranaire; E : Boucle extracellulaire; I : Boucle intracellulaire
- Figure 4 page 39
Changement de la configuration du récepteur au glucagon suite à la liaison de son ligand. Récepteur à sept domaines transmembranaires. NH₂ : Extrémité amino-terminale; COOH : Extrémité carboxyle-terminale; E : Boucle extracellulaire; I : Boucle intracellulaire
- Figure 5 page 40
Schématisation de la voie de signalisation moléculaire du glucagon. PIP2 : phosphatidylinositol 4,5-biphosphate, PGC-1 : peroxisome proliferator-activated receptor- γ coactivator-1; PEPCCK : phophoénolpyruvate carboxykinase; G-6-Pase :

glucose-6-phosphatase; AC : adénylate cyclase; α , β , γ : sous-unités α , β et γ des protéines; $G_{s\alpha}$: Protéine G stimulantes.

Figure 6

page 33

Représentation de la désensibilisation des récepteurs aux protéines G suite à son activation par un agoniste. β arr : bêta-arrestine; E : effecteur (adénylate cyclase); G : protéines G; GRK : kinases des récepteurs couplés aux protéines G; H : hormone; • phosphate

Figure 7

page 49

Perturbations métaboliques résultants de l'accumulation de triglycérides hépatiques lors de la résistance à l'insuline. ACC : Acétyl-CoA carboxylase; AGL : Acides gras libres; β -OX : Béta-oxydation; ChREBP : *Carbohydrate response element-binding protein*; CK : Cycle de krebs; CPT-1 : carnitine-palmitate transférase; FAS : *Fatty Acid Synthase*; LHS : Lipase hormono-sensible; ROS : *Reactive oxygen species*; SREBP-1C : *sterol regulatory element-binding protein-1*; TNF- α : *Tumor necrosis factor-1*.

Figure 8

page 160

Contrôle de la gluconéogenèse par l'insuline et le glucagon.
A : rôle de l'insuline dans la gluconéogenèse post-prandiale;
B : rôle du glucagon dans la gluconéogenèse à jeun.

Figure 9

page 161

Contrôle de la gluconéogenèse par l'insuline et le glucagon.
C : perte d'inhibition de l'insuline lors d'une pathologie; D; rôle hypothétique de la résistance au glucagon pour rétablir la gluconéogenèse

Rôle de la *Regulatory-G protein Signaling Protein* dans l'activation des protéines G dans les récepteurs couplés aux protéines G. GTP : Guanine tri-phosphate; GDP : Guanine di-phosphate; Pi : phosphate inorganique; GAP : *guanosine triphosphatase-activating proteins*; RGS : *Regulators of G-protein signaling*; α , β , γ : sous-unités alpha, beta et gamma de la protéine G hétérotrimérique

Modèle hypothétique d'induction de la résistance hépatique au glucagon lors d'une stéatose hépatique induite par une diète riche en lipides. $\alpha\beta\gamma$: Protéine G hétérotrimérique; AC : adénylate cyclase; AGL : Acides gras libres; Barr : Beta Arrestine; cAMP : Adénosine mono phosphate cyclique; $G_{s\alpha}$: Protéine G stimulante; GRK : *G-Protein related kinase* LHS : Lipase hormono-sensible; PHG : Production hépatique de glucose; RGS : *Regulators of G protein signaling*; TNF- α : *Tumor necrosis factor-1*; TNF- α Rc : *Tumor necrosis factor-1 cytosolic receptor*.

Liste des abréviations

- AC : Adénylate cyclase
- ACC : Acétyl-CoA carboxylase
- ADN : Acide désoxyribonucléique
- AGL : Acides gras libres
- AKAP : *A-Kinase Anchoring Protein*
- ANOVA : analyse de variance
- ARNm : Acide ribonucléique messenger
- β ARR : Béta-arrestine
- Bmax : Densité d'un récepteur
- AMPC : Adénosine monophosphate cyclique
- CPT : carnitine-palmitate transférase
- CREB : *cAMP response element-binding protein*
- ERK 1/2 : *Extracellular-regulated kinase*
- Ex-4 : Exendine-4
- Fas : *Fatty acid synthase*
- FOXa2 : *forkhead transcriptional factor*
- Gi : Protéine G inhibitrice
- Gs : Protéine G stimulante
- GHRH : *Growth Hormone Releasing Hormone*
- GIP : *Glucose Inhibitory Polypeptide*
- GLP : *Glucagon-like peptide*
- Gly₄₀Ser : Polymorphisme du récepteur au glucagon
- GPCR : *G-protein coupled receptors*
- GRK : *G-protein related kinases*

- HNF-1 : *hepatic nuclear factor 1*
- IKK β : *IkappaB kinase- β*
- IL : Interleukine
- IP₃ : Inositol-3-phosphate
- IRS : *insulin receptor substrate*
- K_d : Affinité du récepteur pour son ligand
- MAPK : *Mitogen-activated protein kinase*
- PEPCK : Phosphoénolpyruvate carboxykinase
- PGC-1 : *peroxisome proliferator-activated (PPAR)- coactivator-1*
- PHG: Production hépatique de glucose
- PKA : Protéine kinase A
- PKC : Protéine kinase C
- PPAR : *peroxisome proliferator-activated receptor-gamma*
- RAMP : *Receptor Activity Modifying Protein*
- RCPG : Récepteurs couplés aux protéines G
- RG : Récepteur au glucagon
- RGS : *Regulators of G-protein signaling*
- ROS : *Reactive oxygen species*
- SDS-PAGE : *Sodium dodecyl sulfate - polyacrylamide gel electrophoresis*
- SHNA : Stéatose hépatique non-alcoolique
- SREBP : *Sterol regulatory element-binding protein*
- ST-18 : Anticorps du récepteur hépatique au glucagon
- TNF-1: *Tumor necrosis factor-1*
- TNF-Rc : *Tumor necrosis factor cytosolic receptor*

NASH : *Non-alcoholic steatohepatosis*

NF_κB : *Nuclear factor-kappa B*

La dédicace

À mon père,
pour m'avoir inculqué le sens
du devoir,
de l'effort,
de la persévérance
et de l'honneur.

Do what is right and not what is easy
-Jacques Charbonneau

Les remerciements

À tous ceux et celles qui m'ont aidé, soutenu, écouté, enduré au cours des quatre dernières années, je vous dis merci.

Merci à Chantal : Pour qui je décrocherais la lune et pour m'avoir soutenu durant ces quatre années.

Merci à Jean-Marc : Ce dernier a réussi à me motiver tout au long de mes études doctorales. Son ouverture d'esprit et ses conseils prodigieux m'ont permis de mener à terme des projets originaux et créatifs. Discrètement, et sans pression, il m'a incité à surpasser mes limites. Pour l'ensemble de son œuvre (!!!) je lui dis merci.

Merci à Pierre « sweet Pete » Corriveau : Pour avoir partagé son temps, sa patience, mais surtout ... ses connaissances.

Merci à François Péronnet : Cet homme impose le respect par sa seule présence. Lorsque cet homme vous parle, vous corrige...vous êtes mieux d'écouter!...et d'enregistrer! Ce fut un honneur pour moi d'avoir fait la connaissance de cet homme de science: j'espère, un jour, avoir une fraction de sa rigueur, sa connaissance, sa passion et son dévouement. Merci.

Merci à Hugo « Maurice » Centomo : Pour avoir compris et partagé mes moments les plus sombres....en plus d'être LE complice par excellence....merci Maurice!!!!

Merci à Mariannick Marcil : Pour avoir été, et qui restera à tout jamais, une sœur pour moi.

Merci à Karine Bourduas: Pour sa détermination et sa persévérance.

Merci à Nathalie Chapados : Pour sa joie de vivre qui a rehaussé plus d'une journée grise

Merci à Marie-Ève Mathieu : Pour m'avoir calmé à chaque fois que je regardais dans ses yeux

Merci à Florence Conus : Un mot : résilience!

Merci à Alexis Ascah : Pour m'avoir fait sentir plus jeune que mon âge

Merci à Johanne Roy, Chantale Lalande, Francine Normandeau, Lucille Caron et Micheline Therrien : Pour avoir accepté mes retards, mes oublis....le personnage que je suis!

Merci à Charles Aznavour : Pour m'avoir accompagné tout au long de mon doctorat!!!

Finalement, **merci au Mouton Noir de Val-David :** Merci à Annie, Mirka, Eric, Nicole, Sébastien et tous les employés de ce petit café pour m'avoir « hébergé » de

longues heures durant, pour l'inspiration des lieux et pour les meilleurs Cafés Lattes de ce monde.

Merci à tous

Chapitre 1
LE GLUCAGON

1. Le glucagon

1.1. Introduction

Le glucagon est une hormone polypeptidique de 29 acides aminés produite suite à la maturation protéolytique primaire du proglucagon dans les cellules alpha des îlots de Langerhans. La biosynthèse du proglucagon en glucagon dans les cellules alpha nécessite l'enzyme endopeptidase proprotéine convertase PC2 (70, 71, 174, 175). Le proglucagon est également responsable de la biosynthèse d'hormones polypeptidiques spécifiques comme la GLP-1, la GLP-2 (*Glucagon Like Peptide 1 and 2*), la glicentine et l'oxytomoduline. Toutefois, la formation de GLP nécessite la proprotéine convertase PC1-3 présente dans les cellules L des intestins (174, 175).

Il est reconnu que la baisse de la glycémie représente le stimulus le plus puissant de la sécrétion de glucagon (Section 1.2). Les autres facteurs favorisant la libération du glucagon des cellules α du pancréas sont l'augmentation de la concentration plasmatique d'acides aminés gluconéogéniques, de cholécystokinine, de cortisol, d'acétylcholine et de théophylline. Au repos, le principal rôle physiologique du glucagon est de maintenir la glycémie en augmentant la production hépatique de glucose. Pour ce faire, le glucagon active la glycogénolyse hépatique tout en augmentant la gluconéogenèse à partir des acides aminés présents dans le foie (1.3.2.). Ainsi, chez l'homme, le glucagon représente une hormone clé dans l'homéostasie glucidique. Parallèlement, le glucagon semble avoir de faibles effets lipolytiques. Concomitamment, ces effets lipolytiques augmentent la formation de corps cétoniques par la dégradation des triglycérides présents dans le foie. Le glucagon a également un effet inotropique sur le cœur en plus de stimuler la lipolyse adipocytaire, la sécrétion d'hormones de croissance, d'insuline et de somatostatine (Tableau 1). Bien que le glucagon est en mesure d'activer la glycogénolyse hépatique, il est incapable d'activer la glycogénolyse musculaire en raison de l'absence de récepteurs au niveau des muscles squelettiques (164)

Tableau 1. Fonctions principales du glucagon

Foie
<ul style="list-style-type: none"> • Activation de la glycogénolyse • Activation de la gluconéogenèse • Activation de la lipolyse • Inhibition de la glycogénèse • Inhibition de la glycolyse • Activation de la cétogenèse • Activation de la protéolyse
Coeur
<ul style="list-style-type: none"> • Effet inotropique
Adipocytes
<ul style="list-style-type: none"> • Activation de la lipolyse
Reins
<ul style="list-style-type: none"> • Activation de la glycogénolyse • Activation de la gluconéogenèse
Pancréas
<ul style="list-style-type: none"> • Sécrétion d'insuline • Sécrétion de somatostatine

Le glucagon agit sur les cellules par l'intermédiaire de son récepteur (Section 1.4.). Le récepteur au glucagon (RG) est un récepteur à sept domaines transmembranaires couplé aux protéines G_s et G_q (GPCR) qui compte 485 acides aminés (101). La cascade de signalisation intracellulaire activée par le glucagon se fait via l'adénylate cyclase et la phospholipase C (Section 1.4.). Dans de nombreux tissus, ces voies de signalisation sont impliquées dans la régulation des substrats énergétiques, dans la libération de calcium et dans l'activation des MAP kinases (MAPK, ERK1/2). Le foie, le pancréas, les reins, les intestins, les adipocytes et le pancréas comptent parmi les organes cibles du glucagon (Tableau 1) (43, 44, 28).

L'exercice est également un stimulus de la sécrétion de glucagon. Lors d'un effort physique prolongé, les concentrations plasmatiques d'insuline diminuent tandis que les concentrations plasmatiques de glucagon s'élèvent. Ainsi, les changements de concentrations plasmatiques de ces hormones contribuent à maintenir les concentrations de glucose adéquates pour les besoins énergétiques de la tâche : la diminution du ratio molaire d'insuline-glucagon favorise l'activation de la glycogénolyse et de la gluconéogenèse lors d'un effort physique prolongé. De

plus, avec l'entraînement et l'exercice en endurance, la sensibilité du foie au glucagon augmente significativement (61, 62, 117). Ceci se traduit par une plus grande efficacité du foie, tant au repos qu'à l'effort, à répondre au glucagon malgré de plus petites concentrations plasmatiques de cette hormone. Ainsi, en plus d'avoir un rôle important dans l'homéostasie glucidique au repos, le glucagon est important pour le contrôle énergétique lors d'efforts physiques.

La motivation principale pour l'étude du métabolisme du glucagon s'explique par le fait qu'il existe de nombreuses questions sans réponse en ce qui a trait aux rôles de cette hormone dans des physiopathologies telles l'obésité, la stéatose hépatique non-alcoolique (SHNA) et le diabète de type 2. Chez des patients atteints du diabète de type 1 et 2, des changements dans la régulation des concentrations plasmatiques de glucagon et d'insuline engendrent des effets délétères graves sur l'organisme : résistance à l'insuline, hyperglycémie, hyperinsulinémie, stress oxydatif, athérosclérose, problèmes cardiaques. Dans le l'intolérance au glucose et le diabète de type 2, l'hypothèse d'une défectuosité bi-hormonale a été mise de l'avant pour expliquer l'hyperinsulinémie et l'hyperglycémie. Il semble qu'une augmentation anormale des concentrations relatives de glucagon en fonction de l'insuline soit une cause importante de l'apparition des effets découlants de ces pathologies. En effet, la sous-utilisation du glucose lors de la résistance à l'insuline jumelée à la surproduction de glucose due à une augmentation des concentrations plasmatiques de glucagon contribuent à l'hyperglycémie et confère au glucagon un rôle important dans la pathogenèse du diabète (2, 111, 178). Par contre, bien que l'on connaisse amplement le rôle du glucagon dans le métabolisme glucidique à l'état basal et lors d'efforts physiques, peu d'informations sont disponibles en ce qui a trait à la sensibilité hépatique du glucagon lors d'une pathologie comme l'obésité, la SHNA et le diabète. De plus, il est maintenant accepté que l'exercice aigu et chronique améliore la sensibilité hépatique à l'insuline et au glucagon chez l'homme (61, 62, 117, 129). Toutefois, bien que l'entraînement en endurance augmente la sensibilité à l'insuline lors d'une physiopathologie comme la SHNA (52, 54, 78, 186), nous ne savons pas encore quel est le rôle de l'exercice physique sur la sensibilité hépatique du glucagon lors d'une telle pathologie.

1.2. Le glucagon : régulateur de l'homéostasie glucidique *in vivo*

Le glucagon joue un rôle clé dans le métabolisme du glucose *in vivo*. En accord avec son rôle contre-régulateur à l'insuline, le glucagon augmente les concentrations plasmatiques de glucose en réponse à une hypoglycémie induite par l'insuline (66). En raison de son action hyperglycémisante, l'administration de glucagon est appliquée en milieu hospitalier pour corriger l'hypoglycémie (33, 57, 86). Lors d'études utilisant le modèle humain ou animal, l'administration de glucagon dans des conditions de jeûne et post-prandiaux résulte en une augmentation des concentrations plasmatiques de glucose (66, 96, 139, 118, 217). Ainsi, le glucagon n'est pas seulement un régulateur de la glycémie à jeûn, mais joue un rôle prépondérant dans l'homéostasie glucidique peu importe l'état énergétique. Plusieurs études *ex vivo* et *in vitro* utilisant le modèle de perfusion de foie isolé ont montré que l'augmentation de la production de glucose résultant d'une administration de glucagon est le fruit d'une augmentation de la glycogénolyse et de la gluconéogenèse (57, 98, 128, 209, 210).

Le glucagon est donc un régulateur de l'homéostasie glucidique répondant efficacement aux perturbations de la glycémie. Lors d'une diminution de la glycémie, le glucagon a la capacité d'agir rapidement sur l'organisme et ce, malgré de très faibles concentrations. L'administration de petites doses de glucagon lors d'études *in vivo* permet d'augmenter de façon significative les concentrations plasmatiques de glucose : en utilisant des doses jusqu'à 10 fois moins élevées (120 ug) que les doses standard (1000 ug), la production de glucose augmente à des taux similaires pour tous les dosages (86, 118, 139). Par ailleurs, le fait que le glucagon soit sécrété par les cellules α du pancréas de manière pulsative semble être plus efficace pour augmenter rapidement la production hépatique de glucose qu'une sécrétion continue (146). En effet, une sécrétion pulsative de glucagon résulte en une production hépatique de glucose de 40% supérieure à celle observée lors d'une administration continue (149). De plus, en utilisant le modèle du chien conscient, Dobbins et al. ont montré qu'une injection de glucagon augmente la production hépatique de glucose en quelques minutes (15 minutes) pour ensuite se dissiper (3 à 4 heures) (56). Ainsi, en raison de la sensibilité du foie au glucagon et de sa

sécrétion pulsative du pancréas, le glucagon est une hormone efficace pour augmenter rapidement la production hépatique de glucose et réguler adéquatement la glycémie.

Il existe plusieurs preuves que l'inhibition de la voie de signalisation du glucagon *in vivo* résulte en une diminution de la concentration plasmatique de glucose. Chez le rat, l'administration d'un anticorps polyclonal neutralisateur du glucagon a permis d'abolir l'hyperglycémie résultante d'une injection de glucagon (193). De plus l'utilisation d'un anticorps monoclonal neutralisateur du glucagon a permis de normaliser la glycémie chez des rats asymptomatiques et diabétiques ayant reçu une injection de glucagon (23). Ainsi, l'administration de ces anticorps nous permet de reconnaître l'importance de cette hormone dans le contrôle de la glycémie. Bien que nous reviendrons plus tard sur le RG, il est important de mentionner qu'une délétion génique spécifique du RG permet de générer une souris affichant un phénotype particulier caractérisé par une glycémie réduite dans les états post-prandiaux et à jeun (72, 151). Ainsi, par l'utilisation d'anticorps neutralisateurs du glucagon et de souris génétiquement modifiées, les auteurs ont une fois de plus prouvé le rôle du glucagon en tant qu'élément important dans le contrôle de l'homéostasie glucidique *in vivo*.

Comme nous l'avons mentionné précédemment, le glucagon provient de la maturation protéolytique du proglucagon par l'endoprotéase proprotéine convertase PC2 provenant des cellules α du pancréas (70, 71, 174, 175). Or, en utilisant un modèle de souris ayant une délétion génique de PC2 pancréatique (PC2^{-/-}), Furuta et al., (70, 71) ont créé une souris avec un phénotype unique : une présence indétectable de glucagon en circulation, une meilleure tolérance au glucose et une diminution des concentrations plasmatiques de glucose à jeun. De plus, ce phénotype se caractérise par une réduction de l'expression génique de la phosphoenolpyruvate carboxykinase (PEPCK), enzyme hépatique importante de la gluconéogenèse (208). Ainsi, la corrélation entre le phénotype hypoglycémique des souris PC2^{-/-} et l'absence de glucagon démontre, encore une fois, l'importance du glucagon dans le contrôle de la glycémie. Par contre, il est important de mentionner que l'interprétation initiale de ces résultats est difficile à cause d'une défectuosité

dans la maturation protéolytique de la proinsuline en insuline chez cette souris (70, 71). Pour palier à cette difficulté d'interprétation, Webb et al. (208) ont montré que l'administration de glucagon à ces souris PC2^{-/-} peut corriger l'hypoglycémie en plus de normaliser l'expression enzymatique de la PEPCK hépatique (208). Ainsi, cette étude confirme le rôle central du glucagon dans l'homéostasie glucidique en plus de valider le glucagon en tant qu'antagoniste puissant à l'insuline dans la régulation de la glycémie *in vivo*.

1.3. La régulation du métabolisme du glucose par le glucagon

Pour les fins de cette section, nous n'allons que brièvement discuter du RG. Pour plus d'informations sur le RG, veuillez vous référer à la section 1.4.

Le glucagon agit sur les cellules par l'intermédiaire de son récepteur (Section 1.4.). Le RG est un récepteur de 485 acides aminés comptant sept domaines transmembranaires et couplé aux protéines G_s et G_q (*GPCR*) (101) (Figures 3, 4 et 5). La liaison du glucagon sur la boucle extracellulaire de son récepteur entraîne un changement de conformation qui engendre une activation des protéines G couplés au récepteur (Figure 4)

Parmi la multitude de protéines G existantes, les protéines $G_{s\alpha}$ et G_q ont été identifiées comme étant celles qui jouent un rôle important dans la signalisation moléculaire du RG. L'activation de la protéine $G_{s\alpha}$ stimule l'adénylate cyclase qui, à son tour, augmente les concentrations intracellulaires de AMPc et de protéines kinases A (PKA). Quant à la protéine G_q , la stimulation de cette dernière active la phospholipase C, la production d'inositol 1,4,5-triphosphate et la libération intracellulaire de calcium (28, 44). Pour les fins de cette thèse, nous allons concentrer notre discussion sur le rôle du glucagon dans la régulation de la production hépatique de glucose via l'activation de la protéine kinase A. En ce qui a trait aux rôles de la protéine G_q , ils ne seront que brièvement abordés.

1.3.1. Activation de la glycogénolyse

Les principaux effets du glucagon sont observés au niveau du foie (Figure 1). Suite à la stimulation de l'adénylate cyclase et de l'augmentation de l'AMPc, l'activation de la protéine kinase A phosphoryle et active la glycogène phosphorylase kinase. Ceci a pour effet d'augmenter la dégradation de glycogène via la glycogène phosphorylase et ainsi produire du glucose-6-phosphate via le glucose-1-phosphate.

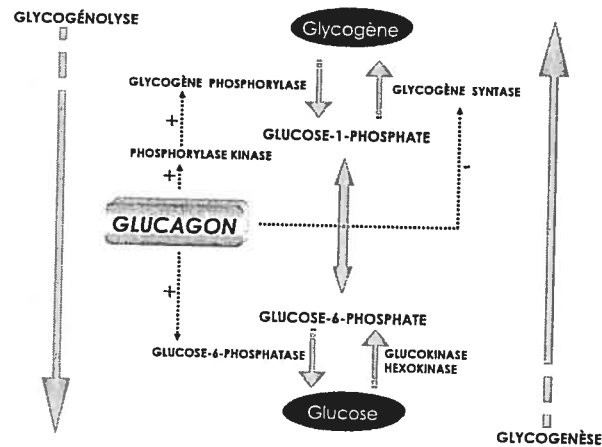


Figure 1: Régulation du métabolisme du glycogène hépatique par le glucagon. Schématisation des effets du glucagon sur la glycogénolyse et la glycogénèse. Les détails des effets du glucagon sur ces métabolismes sont décrits dans le texte

Le glucose-6-phosphate peut ensuite se transformer en glucose grâce à la glucose-6-phosphatase et ainsi augmenter la quantité de glucose pouvant être exportée du foie (107). En plus d'activer la cascade de signalisation « PKA - phosphorylase kinase - glycogène phosphorylase », le glucagon augmente l'activité de la glucose-6-phosphatase dans le foie (9). Yoon et al. ont récemment montré que la régulation à la hausse de la glucose-6-phosphatase par le glucagon est le résultat d'une augmentation transcriptionnelle du gène de la G-6-Pase via l'action de la protéine kinase A (216). Ce rehaussement transcriptionnel serait potentialisé, entre autres, par le facteur de transcription nucléaire PGC-1 (*proliferator-activated receptor-γ coactivator-1*). En plus de contrôler l'expression génique de la G-6-Pase, PGC-1 augmente l'expression de la PEPCK, une autre enzyme clé de la gluconéogenèse. Ainsi, parallèlement à l'activation de la glycogénolyse, le glucagon peut aussi avoir des effets non négligeables sur la transcription d'enzymes clés de la gluconéogenèse via la protéine kinase A (Section 1.3.2)

1.3.2. Activation de la gluconéogenèse

En plus d'avoir des effets spécifiques sur le métabolisme du glycogène, le glucagon régule la glycémie en activant la gluconéogenèse tout en inhibant la glycolyse. (Figure 2)

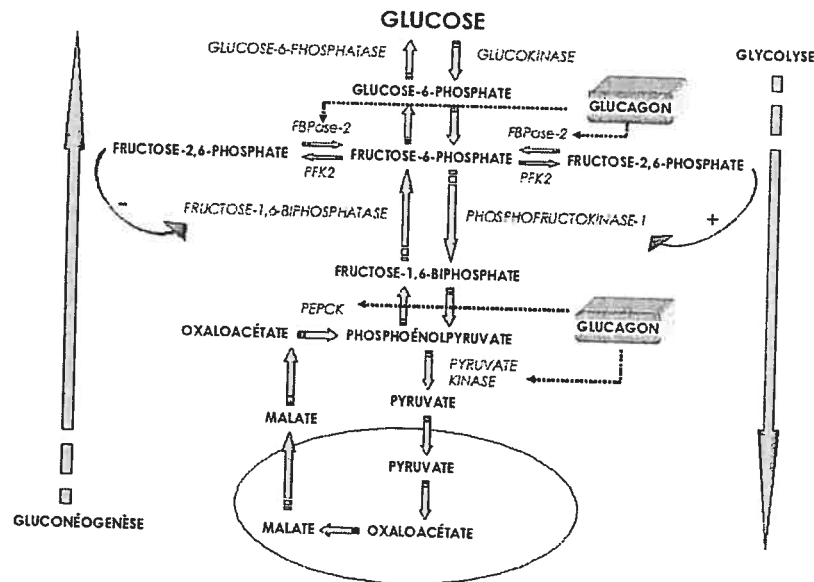


Figure 2 : Régulation du métabolisme hépatique du glucose par le glucagon. FBPase-2 : fructose-2,6-bisphosphatase; PFK2 : 6-phosphofructo-2-kinase; PEPCK : phosphoenolpyruvate carboxykinase. Les détails des effets du glucagon sur ces métabolismes sont décrits dans le texte

La première réaction limitante de la gluconéogenèse est la conversion de l'oxaloacétate en phosphoenolpyruvate. L'enzyme permettant de faciliter cette réaction est la phosphoenolpyruvate carboxykinase (PEPCK). Or, l'administration de glucagon chez le rat permet d'augmenter les concentrations d'ARNm de la PEPCK dans le foie et, ainsi, pourrait favoriser la production de glucose (12, 99). De récentes études ont montré que l'activation de la PKA par la AMPc engendre la phosphorylation du *cAMP response element-binding protein* (CREB). Un fois phosphorylé, le CREB se lie à la *cAMP-responsive element* dans la région du promoteur du gène du facteur transcriptionnel coactivateur (PGC-1) et augmente la transcription de ce dernier. Par la suite, la PGC-1 et le HNF-4 agissent conjointement pour augmenter la transcription du gène de la PEPCK. Ainsi, sachant que le glucagon active la PKA, une telle voie de signalisation est susceptible

d'accroître la gluconéogenèse dans le foie en augmentant la transcription et l'activité de la PEPCK (86, 89, 216).

Quant à la fructose-1,6-biphosphatase, cette dernière catalyse l'hydrolyse du phosphate C-1 sur le fructose-1,6-biphosphate permettant ainsi sa conversion en fructose-6-phosphate. Mais la fructose-1,6-biphosphatase est allostériquement inhibée par le fructose-2,6-phosphate. Les concentrations de fructose-2,6-phosphate sont régulées par l'enzyme bi-fonctionnelle 6-phosphofructo-2-kinase/fructose-2,6-biphosphatase encodée dans un même polypeptide. Bien que le fructose-2,6-biphosphate est produit par la phosphorylation du fructose-6-phosphate par la phosphofructokinase-2, il se reconvertit en fructose-6-phosphate à l'aide de la fructose-2,6-biphosphatase. Suite à la stimulation par le glucagon, l'activation de la PKA phosphoryle le résidu sérine-36 du polypeptide 6-phosphofructo-2-kinase/fructose-2,6-biphosphatase. Ceci a pour effet d'inhiber simultanément la phosphofructokinase-2 et d'activer la fructose-2,6-biphosphatase. Par la suite, la diminution intracellulaire de fructose-2,6-biphosphate abolit l'inhibition de la fructose-1,6-biphosphatase favorisant ainsi la gluconéogenèse (109, 159).

1.3.3. Inhibition de la glycogénèse

En ce qui a trait au métabolisme hépatique du glycogène, le glucagon ne participe pas seulement à la dégradation de ce substrat énergétique. Il permet aussi d'inhiber la synthèse de glycogène en régulant à la baisse la glycogène synthase. Cette enzyme joue un rôle important dans la synthèse de glycogène en catalysant le transfert des résidus glycosyl de l'UDP-glucose à une extrémité non-réduite d'une molécule de glycogène. Le glucagon permet la phosphorylation de la glycogène synthase sur plusieurs sites grâce à diverses kinases (sérine/thréonine) comme la PKA, et inhibe ainsi l'activité de cette enzyme dans le foie (45). Il a été suggéré que la phosphorylation coordonnée de la glycogène synthase par plusieurs kinases peut mener à l'inactivation de cette enzyme. Cette inactivation réduit ainsi la synthèse de glycogène dans le foie en plus d'augmenter la quantité de glucose pouvant être exportée (170).

1.3.4. Inhibition de la glycolyse

En plus d'activer la gluconéogenèse et la glycogénolyse tout en inhibant la glycogénèse, le glucagon a la capacité d'inhiber la glycolyse. Lors de la première étape limitante de la glycolyse, la phosphofructokinase-1 phosphoryle la position C-1 du fructose-6-phosphate pour ainsi convertir ce dernier en fructose-1,6-biphosphate. Comme la fructose-1,6-biphosphatase, la phosphofructokinase-1 est aussi allostériquement régulée par le fructose-2,6-biphosphate. Bien que le fructose-2,6-biphosphatase soit allostériquement inhibé par le fructose-2,6-biphosphate, la phosphofructokinase-1 est allostériquement activée par le fructose-2,6-biphosphate (159). En réduisant les concentrations de fructose-2,6-biphosphate, le glucagon permet d'inhiber la phosphofructokinase-1 et d'ainsi réduire l'activité de la glycolyse.

Dans la dernière réaction de la glycolyse, la pyruvate kinase catalyse le transfert du groupement phosphate du phosphoénolpyruvate à l'ADP créant ainsi du pyruvate et de l'ATP. Or, le glucagon inhibe la pyruvate kinase via multiples mécanismes. Premièrement, comme le glucagon active la PKA, celle-ci phosphoryle la pyruvate kinase. Une fois phosphorylée, cette kinase est rapidement inhibée allostériquement par l'alanine et l'ATP et, conséquemment, moins activée par les concentrations de fructose-1,6-biphosphate. Ainsi, la phosphorylation de la pyruvate kinase inhibe son action (159). De plus, le glucagon inhibe la transcription du gène de la pyruvate kinase tout en augmentant la dégradation de l'ARNm de cette enzyme (157, 158, 159). Donc, l'inhibition de la pyruvate kinase par le glucagon résulte en une diminution de la glycolyse.

1.4. Le récepteur au glucagon

Le RG est un membre de la super-famille des (RCPG) qui représente 1 à 2% des gènes totaux du génome humain. Il existe environ 200 types de RCPG, sans compter les récepteurs olfactifs couplés aux protéines-G dont le nombre est estimé entre 400 à 1000 récepteurs différents. En ce qui a trait au RG, celui-ci est un membre de la famille B des RCPG qui contient également les récepteurs à la sécrétine, aux GLP (*Glucagon Like Peptides*), GIP (*Glucose Inhibitory Polypeptide*), GHRH (*Growth Hormone Releasing Hormone*) et à l'exendine-4 (130). Bien qu'il existe des différences structurales entre les récepteurs des différentes familles, la structure générale d'un RCPG de la famille B est sensiblement identique pour presque tous ses membres.

Le RG possède une extrémité amino-terminale extracellulaire et une extrémité carboxy-terminale intracellulaire. De plus, on observe trois boucles extracellulaires (nommées E1, E2 et E3) sur lesquelles le ligand a la possibilité de se lier et trois boucles intracellulaires (I1, I2 et I3) sur lesquelles les protéines G peuvent interagir (Figure 3).

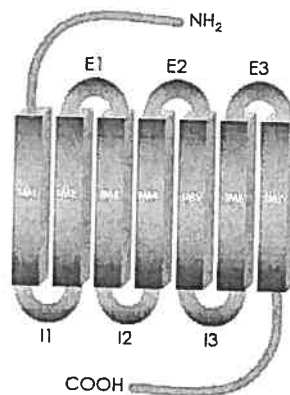


Figure 3 : Récepteur à sept domaines transmembranaires. NH₂ : Extrémité amino-terminale; COOH : Extrémité carboxyle-terminale; TM : Domaine transmembranaire; E : Boucle extracellulaire; I : Boucle intracellulaire

Plus précisément, l'activation des voies de signalisation du glucagon est initiée suite à la liaison du glucagon sur les acides aminés 126 à 137 de l'extrémité amino-terminale extracellulaire ainsi que sur les acides aminés 206 à 219 de la

première boucle extracellulaire (199). De plus, il a récemment été montré que la liaison du glucagon sur l'acide aminé 202 du deuxième domaine transmembranaire (TM2) est unique et spécifique au glucagon : elle est indispensable afin d'initier l'activation de sa voie de signalisation intracellulaire (199). Suite à la liaison du glucagon sur les acides aminés spécifiques, un changement de conformation du récepteur se produit (Figure 4).

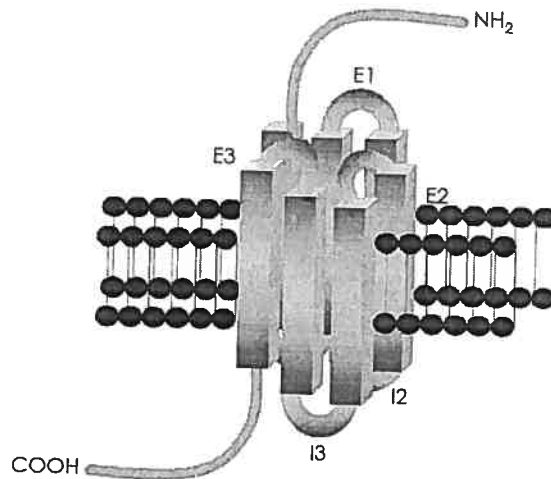


Figure 4 : Changement de la configuration du récepteur au glucagon suite à la liaison de son ligand. Récepteur à sept domaines transmembranaires. NH_2 : Extrémité amino-terminale; COOH : Extrémité carboxyle-terminale; E : Boucle extracellulaire; I : Boucle intracellulaire.

Les sept domaines transmembranaires se replient sur eux-mêmes pour produire une forme cylindrique dans laquelle les boucles intracellulaires se rapprochent l'une de l'autre. Par ce changement de configuration, la protéine G stimulante (Gs_α) peut se lier simultanément aux boucles intracellulaires I2 et I3 et ainsi initier la voie de signalisation de la « AC-AMPc-PKA » (199, 200).

Plus précisément, la liaison du glucagon sur les acides aminés 126 à 137, 206 à 219 et 202 entraîne le repli du RG et approche les boucles intracellulaires I2 et I3. Par la suite, une protéine G hétérotrimérique contenant des sous-unités α , β et γ se colle aux boucles I2 et I3. Cependant, la sous-unité α de la protéine G hétérotrimérique est la seule à se coller aux boucles I2 et I3. Après l'échange de GTP pour la GDP, la sous-unité alpha de la protéine G ($\text{Gs}_\alpha\text{GTP}$), se dissocie du récepteur et des sous-unités bêta et gamma (β , γ). Tant le $\text{Gs}_\alpha\text{GTP}$ et le dimère $\beta\gamma$ peuvent moduler des effecteurs en aval dans cette voie de signalisation. Le glucagon

active donc l'adénylate cyclase via la protéine G hétérotrimérique G_s pour produire la AMPc, l'effecteur principal du glucagon (199, 200) (Figure 5).

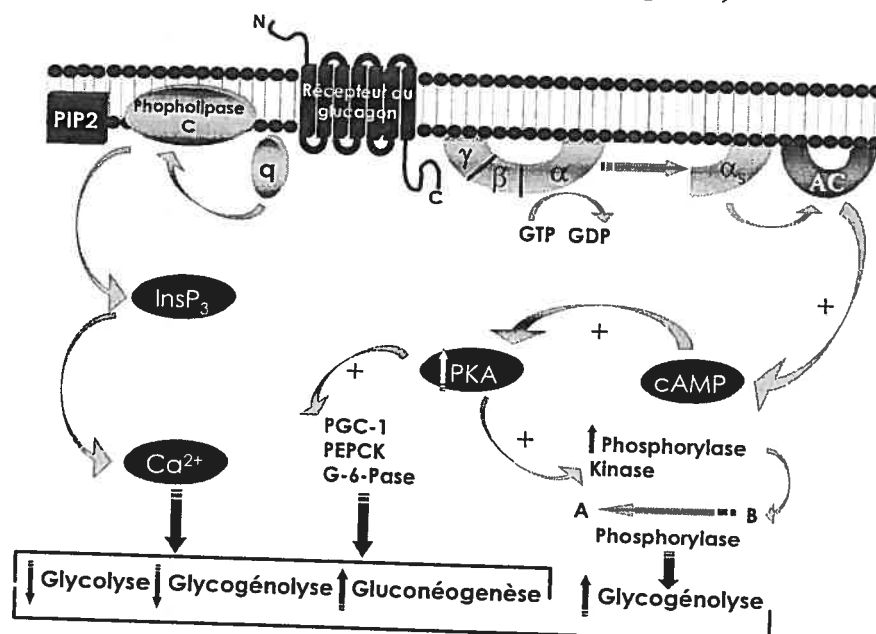


Figure 5: Schématisation de la voie de signalisation moléculaire du glucagon. PIP₂ : phosphatidylinositol 4,5-biphosphate, PGC-1 : *peroxisome proliferator-activated receptor-γ coactivator-1*; PEPCK : phosphoenolpyruvate carboxykinase; G-6-Pase : glucose-6-phosphatase; AC : adénylate cyclase; α - β - γ : sous-unités α, β et γ des protéines G; G_s : Protéine G stimulantes.

Cependant, le glucagon peut aussi activer des voies de signalisation « alternatives » menant à l'augmentation intracellulaire de seconds messagers additionnels (IP₃) et de calcium (82). Il est suggéré, mais non prouvé, que le RG peut être couplé à la voie de signalisation des phosphoinositides (IP₃) via les protéines G_q ou G₁₁. Par contre, des études subséquentes montrent que l'augmentation intracellulaire de calcium et d'IP₃ résulte d'une activation de la protéine kinase A via l'augmentation de la AMPc (185). Ainsi, la production d'IP₃ et de calcium par le glucagon provient probablement d'une synergie mécanistique encore inconnue entre différents effecteurs de signalisation (199). Certains avancent l'hypothèse que les voies de signalisation des différents RCPG ne seraient pas spécifiques à une seule hormone : les différents RCPG pourraient s'activer ou s'inhiber mutuellement, créant ainsi des voies de signalisation hétérogènes dont les effets finaux seraient beaucoup plus complexes que l'on ne croit (199).

Récemment, une lignée cellulaire exprimant le RG a la capacité d'activer la « *mitogen-activated protein kinase* » (MAPK), causant ainsi une phosphorylation de la « *extra-cellular signal-regulated protein kinases* » (ERK1/2) suite à une incubation avec le glucagon (102). Bien que les RCPG n'ont pas l'activité de tyrosine kinase nécessaire pour se coupler aux MAP kinases, les protéines $G_{s\alpha}$, elles, ont cette possibilité. Il apparaît donc que le glucagon joue un rôle important dans les voies de signalisation contrôlant le cycle cellulaire (166, 122). Or, il semble que la transactivation des MAPK par le glucagon se fasse via les protéines $G_{s\alpha}$ et ce avec une augmentation des concentrations intracellulaires de calcium et de protéine kinase A. Bien que le glucagon semble activer diverses voies de signalisation (MAPK, IP_3 , AC), nous ne connaissons pas encore les mécanismes et les raisons physiologiques qui modulent les changements de voies de signalisation du glucagon.

Chez la majorité des RCPG, l'activation des phospholipase C se fait via les protéines G_q et G_{11} . Bien qu'il a été prouvé que le glucagon génère de l'AMPc via son récepteur et ses protéines $G_{s\alpha}$, l'impact du glucagon et de son récepteur sur les protéines G_q est moins clair. L'utilisation d'un antagoniste au glucagon, le (1-N-alpha-trinitrophenylhistidine,12-homoargine)-glucagon, a la capacité de stimuler la production d'inositol phosphates sans activer l'adénylate cyclase (138, 202). L'interprétation de ces résultats a mené à élaborer l'hypothèse de la présence de deux types de récepteurs hépatiques au glucagon : un couplé à l'adénylate cyclase et un second couplé à la phospholipase C. Une autre avenue d'interprétation est que les différents récepteurs au glucagon activent deux voies de signalisation parallèles via différentes protéines G (202). Subséquemment, une mutagenèse des domaines cytoplasmiques du RG a montré que la seconde (I2) et la troisième (I3) boucle intracellulaire contribuent conjointement à l'activation de la protéine $G_{s\alpha}$. En retirant une ou les deux boucles intracellulaires, une diminution marquée de l'activation de l'adénylate cyclase par le glucagon est remarquée. Par la suite, le remplacement de la boucle I2 et I3 du RG par la boucle I1 du récepteur D4-dopamine a éliminé toutes les activités intracellulaires du glucagon (49, 102, 103). Ainsi, par cette démonstration, il semble n'exister qu'un seul RG dont l'activation de la voie de signalisation intracellulaire est principalement sous le contrôle des protéines $G_{s\alpha}$.

Les RG, comme tous les RCPG, ne sont pas des structures immuables au niveau de la membrane plasmique. Ce sont des structures en mouvement qui ont la capacité de se désensibiliser, s'internaliser à l'intérieur de la cellule et/ou être recyclé de nouveau à la membrane plasmique (73, 85, 114, 115, 116, 121). Ce mécanisme de désensibilisation des RG remplit une fonction très importante : protéger la cellule d'une stimulation trop prononcée par le glucagon. La prochaine section s'attardera aux mécanismes de désensibilisation des RCPG.

1.5. La désensibilisation du récepteur au glucagon

La désensibilisation est une propriété importante du fonctionnement des RCPG : elle a pour but d'arrêter le couplage entre les récepteurs et les protéines G pour stopper la signalisation intracellulaire. Par exemple, dans les hépatocytes, la désensibilisation des récepteurs au glucagon protège le glycogène des cellules d'une stimulation chronique au glucagon : la désensibilisation se produit pour éviter une baisse trop drastique du contenu en glycogène des hépatocytes. Cependant, une baisse d'efficacité des RCPG est également une barrière importante à surmonter dans le traitement de plusieurs pathologies. Un pourcentage élevé de médicaments administrés dans le traitement de maladies telles que le diabète de type 2, le Parkinson, l'alzheimer, cible un RCPG (130). Lors d'un traitement chronique avec un médicament agoniste ou antagoniste aux RCPG, une baisse d'efficacité des médicaments utilisés pour traiter ces maladies chroniques est souvent observée : ceci est le résultat d'une désensibilisation des récepteurs.

Conséquemment, la compréhension des mécanismes de désensibilisation est une voie de recherche primordiale pour la mise au point de médicaments adaptés aux contraintes de la désensibilisation des récepteurs (6). Concrètement, l'agoniste sélectif du récepteur GLP-1, l'Ex-4 (exendin-4), est utilisé pour diminuer la glycémie, l'appétit et la vidange gastrique chez des patients atteints du diabète de type 2. Cependant, un traitement chronique à l'Ex-4 induit une tolérance rapide et une désensibilisation des récepteurs GLP-1 : il en résulte une perte d'efficacité du médicament et une autre avenue de traitement doit donc être envisagée (6). Bien que ces phénomènes de désensibilisation soient parfois différents entre des modèles *in vivo* et *in vitro*, il demeure que la compréhension des mécanismes inhérents à ce phénomène physiologique est de première importance afin de comprendre l'effet d'une hormone ou d'une drogue sur l'organisme. La majorité des phénomènes détaillés dans la présente section est décrite pour les récepteurs de la famille B des RCPG dont le glucagon fait partie. Les nombreuses ressemblances de fonction entre les récepteurs de cette famille (activation de l'adénylate cyclase, protéines G_{sa} , AMPc...) laissent penser que les mécanismes mis en jeu lors de la désensibilisation sont semblables (130).

1.5.1 La désensibilisation homologue

La stimulation prolongée d'une cellule par un ligand extracellulaire tel que le glucagon entraîne une diminution de la sensibilité de la cellule à cette molécule. Le mécanisme de cette désensibilisation homologue, dépend principalement de la régulation de l'activité des récepteurs. Dans la cellule, l'activation prolongée par un agoniste se traduit par une diminution de l'affinité du récepteur pour son ligand, par une baisse de son couplage aux protéines G et par une diminution du nombre de récepteurs à la surface cellulaire (85). En mesurant la modification de l'affinité apparente du complexe récepteur/agoniste, certaines analyses pharmacologiques ont mis en évidence l'existence de ces étapes distinctes de la désensibilisation (91). Le rôle de la désensibilisation est donc de protéger une cellule contre les effets délétères d'une stimulation excessive (tant aiguë que chronique) par son ligand.

Les mécanismes cellulaires et moléculaires qui expliquent cette perte de sensibilité ainsi que la réduction de sites de liaisons font présentement l'objet de plusieurs études dans le domaine de la recherche pharmaceutique (130). Depuis quelques années, notre compréhension des mécanismes responsables de la désensibilisation des récepteurs couplés aux protéines G a nettement évolué. La désensibilisation, ou la phosphorylation des RCPG, est facilitée par deux familles de protéines kinases : les protéines kinases dépendantes (*cAMP-dependent protein kinase*, PKA) et les kinases des récepteurs couplés aux protéines G (*GRKs*). Suite à l'activation d'un RCPG par son agoniste, les *GRK* phosphorylent des sites intracellulaires spécifiques sur le récepteur et facilitent la liaison des β -arrestines (116). La β -arrestine-1 est un membre de la famille des arrestines, reconnue pour sa capacité d'interagir avec les RCPG après que les protéines kinases spécifiques (*GRK*) aient phosphorylées ces derniers. Cette interaction de forte affinité entre l'arrestine et le récepteur phosphorylé est responsable du découplage fonctionnel du récepteur de la protéine G, et donc, de la désensibilisation de la voie de signalisation (22). Grâce à des domaines d'interactions avec les protéines adaptatrices de la clathrine (110), les arrestines entraînent les récepteurs vers les puits tapissés de clathrines conduisant à leur endocytose (Figure 6).

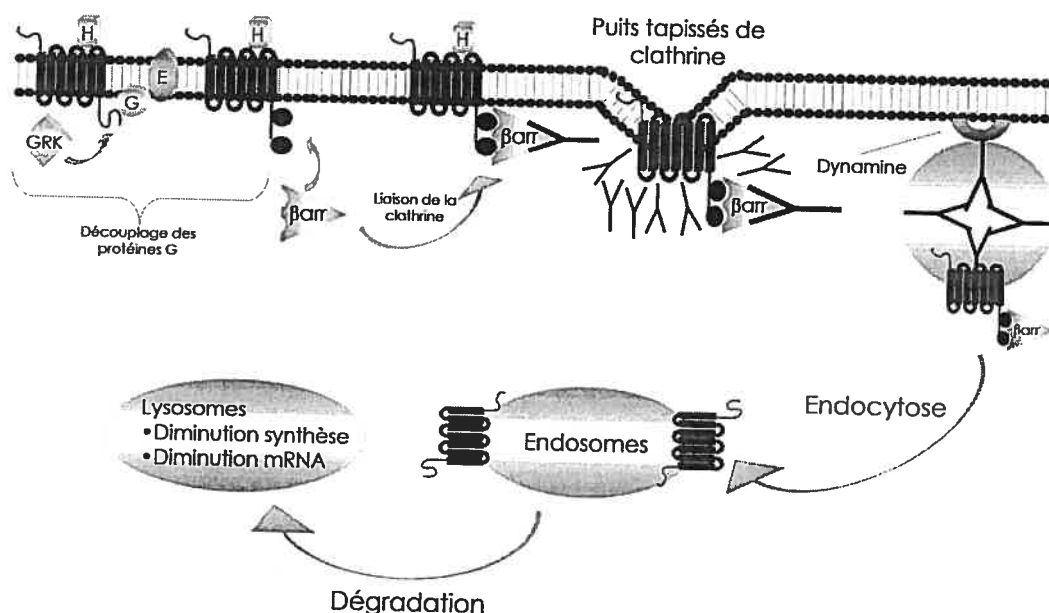


Figure 6 : Représentation de la désensibilisation des récepteurs aux protéines G suite à son activation par un agoniste. βarr : bêta-arrestine; E : effecteur (adénylate cyclase); G : protéines G; GRK : kinases des récepteurs couplés aux protéines G; H : hormone; • phosphate. Adapté de (63)

Nous ignorons toujours si la séquestration des récepteurs dans les endosomes et leur dégradation subséquente, dans les lysosomes, représente l'unique mécanisme pouvant expliquer la dégradation des RCPG. Quelques études montrent que certains récepteurs ont la capacité d'être directement internalisés dans les lysosomes via un mécanisme d'endocytose cellulaire distincts (10, 31). Zhang et al. ont montré que l'internalisation des RCPG pour l'angiotensine II peut se faire via l'action de la PKA sans l'intervention des GRK (218). Il semble donc que plusieurs modèles cellulaires et moléculaires existent pour expliquer la désensibilisation des RCPG suite à une stimulation par leur ligand. Cependant, il est important de spécifier que les RCPG se répartissent parmi 6 familles de récepteurs (A à F). Bien que chaque famille de RCPG semble avoir des mécanismes de désensibilisation bien différents des autres, les RG, appartenant à la famille B des RCPG, pourraient se désensibiliser et s'internaliser grâce à l'action des GRK et des β-arrestines (63).

1.5.2. La désensibilisation hétérologue

La désensibilisation d'un RCPG peut également être hétérologue, c'est-à-dire indépendante d'un ligand spécifique, mais provoquée par l'activation d'un autre récepteur sur la même cellule ou par la présence d'éléments intracellulaires ayant la capacité d'activer des kinases responsables de la désensibilisation. Ce type de désensibilisation fait intervenir la protéine kinase A (PKA) activée par l'AMPc ou par la protéine kinase C (PKC) qui phosphorylent les GRK via les diacylglycérols (160).

Les premières preuves de la fonction régulatrice de la PKA dans la désensibilisation des RCPG ont été obtenues grâce à l'utilisation d'un analogue de l'AMPc. L'utilisation d'érythrocytes *in vivo*, incubés en présence d'un analogue de l'AMPc, a montré le rôle de la PKA dans la phosphorylation du récepteur β_2 -adrénergique (183). Toutefois, la preuve indéniable nous permettant de croire au rôle régulateur de la PKA dans la désensibilisation des RCPG provient de l'utilisation d'inhibiteurs de la PKA (121). En inhibant l'activité de la PKA, la désensibilisation des RCPG est nettement diminuée. Mais, le mécanisme par lequel la phosphorylation par la PKA inhibe l'interaction récepteur-protéines $G_{s\alpha}$ est encore nébuleux. La théorie de l'altération des charges induite par phosphorylation du récepteur par la PKA est avancée pour expliquer la réduction du couplage, mais ne suffit pas pour expliquer le rôle de la PKA dans la désensibilisation des RCPG (145). De plus amples études sont donc nécessaires pour expliquer ce mécanisme de désensibilisation.

La protéine kinase C est également impliquée dans la désensibilisation hétérologue de nombreux récepteurs tels que le récepteur muscarinique M1 (81), le récepteur de la vasopressine (219), le récepteur de l'angiotensine II (147) et le récepteur de la somatostatine sst2A (90). Cette inactivation des RCPG par les protéines kinases C repose sur la translocation de la PKC du cytosol vers la membrane plasmique afin de phosphoryler les GRK (136). Par la suite, les GRK phosphorylent des sites spécifiques sur le récepteur et facilitent la liaison des β -arrestines et activent la désensibilisation. Bien que les preuves de l'implication de la

PKC sur la désensibilisation des RCPG de la famille B sont rares, on sait que l'augmentation de lipides hépatiques sous la forme de phospholipides active les protéines kinases C (PKC) et augmente la phosphorylation des GRK (50, 160). Il est donc possible que la désensibilisation hétérologue des RCPG de la famille B puisse se produire via la phosphorylation des GRK par la PKC lors de physiopathologies présentant une infiltration hépatiques de lipides.

La concentration de l'agoniste et la palmitoylation des résidus de cystéine localisés dans l'extrémité C-terminale du récepteur semblent être les facteurs les plus importants pour induire la phosphorylation d'un RCPG lors d'une désensibilisation hétérologue. Il semble que le rôle de la PKA soit prédominant à faibles concentrations en ligand (121), tandis qu'à forte concentrations, la désensibilisation est facilitée par les deux classes de kinases, soit PKA et PKC (147). Bien que le rôle des GRK dans la désensibilisation soit bien établi, la contribution relative des GRK versus PKA/PKC semble être dépendante du type cellulaire et de la présence ou non de lipides en excès (166). Par exemple, la plupart des RCPG possède un ou deux résidus de cystéine localisés sur l'extrémité C-terminale. La palmitoylation de ces acides aminés ancre une portion de cette extrémité au niveau de la membrane plasmique créant ainsi une quatrième boucle intracellulaire. Cette modification affecte par la suite le découplage du récepteur en plus de favoriser le trafic intracellulaire des RCPG. En effet, l'état dépalmitoylé d'un RCPG semble le rendre plus susceptible à la phosphorylation par la PKA et, ainsi, à la désensibilisation de ce dernier (137). De par ces faits, une modification dans la nature du contenu intracellulaire pourrait affecter les mécanismes de désensibilisation des RCPG.

1.5.3. Le devenir des RCPG endocytés

Les mécanismes conduisant à l'endocytose des RCPG sont de nature homologue ou hétérologue, dépendant des GRK, des PKA et/ou des PKC. Quant aux devenirs intracellulaires des RCPG, ceux-ci varient significativement. Pour la majorité des RCPG, l'internalisation est réversible et les RCPG séquestrés sont recyclés vers la membrane : par contre, dépendamment de l'intensité de la stimulation du récepteur ou la présence d'éléments favorisant une désensibilisation

hétérologue, les récepteurs peuvent aussi être dégradés dans les lysosomes (20, 201). En ce qui a trait à l'étape du recyclage, la dissociation du complexe ligand-récepteur et des arrestines, opérées au niveau des endosomes, est indispensable (Figure 6). Pour quelques RCPG, tels que les récepteurs de la thrombine, l'internalisation est irréversible (180). Ces récepteurs activés par clivage de leurs extrémités N-terminales traversent rapidement les endosomes et finissent par être dégradés dans les lysosomes. Par contre, bien que les mécanismes de désensibilisation des récepteurs de la famille B des RCPG sont connus, les informations sur les particularités du mécanisme de désensibilisation du RG sont limitées. De plus amples informations sont nécessaires pour élucider les mécanismes inhérents à la désensibilisation des RG.

1.6. Le rôle du glucagon lors de l'exercice et de l'entraînement en endurance

Lors d'un exercice prolongé, Wasserman et al. (203, 204, 205, 206) ont montré, grâce aux techniques de clamps pancréatiques chez des chiens conscients, que l'augmentation moyenne de 65% de la production endogène de glucose est la conséquence d'une augmentation des concentrations plasmatiques de glucagon. Par contre, un tel modèle ne permet pas de distinguer le rôle de l'insuline et du glucagon lors de l'exercice. Pour isoler l'effet du glucagon sur la production endogène de glucose lors d'exercices prolongés, Lavoie et al. (113) ont administré du glucagon à des sujets dont la sécrétion endogène de glucagon avait été inhibée par la somatostatine lors d'un clamp pancréatique. Grâce à cette approche, il fut possible de préciser le rôle de l'augmentation de glucagon et de la diminution de l'insuline induite par l'exercice sur la régulation de la production de glucose. Grâce à l'utilisation du glucose deutéré lors d'un effort physique de 120 minutes (40% du VO_2max), il est montré que la production endogène de glucose double lorsque le glucagon est administré. Par contre, cette production de glucose cesse lorsque le glucagon n'est pas injecté. Bien que le rôle du glucagon lors d'exercices physiques prolongés a été montré chez l'animal (88, 203, 204, 205, 206), les études de Lavoie et al. (112, 113) ont permis de corroborer ces observations chez l'homme.

Un paradoxe de la régulation hormonale suite à un entraînement en endurance est l'amélioration du maintien de l'homéostasie glucidique malgré de faibles augmentations de la concentration plasmatique de glucagon (19, 25, 59, 60, 80, 189, 190). Suite à un entraînement chronique en endurance, il est montré que la réponse des hormones pancréatiques est nettement diminuée lors d'efforts physiques épisodiques. Plus précisément, la diminution de l'insuline et l'augmentation du glucagon, généralement observée durant l'exercice, est quasi inexistante dans les groupes entraînés. Curieusement, malgré cette apparente absence de changements dans les concentrations plasmatiques d'insuline et de glucagon lors de l'exercice, l'habileté à maintenir la concentration de glucose plasmatique est conservée et même améliorée suite à un entraînement chronique en endurance (80). Pour expliquer ce phénomène, il est suggéré que la sensibilité du foie à l'insuline et au glucagon augmente suite à un entraînement en endurance. Préalablement, il fut

montré que l'entraînement en endurance chez l'homme et l'animal avait augmenté la sensibilité à l'insuline tant au niveau musculaire qu'adipocytaire (52, 54, 78, 186). Par contre, bien que plusieurs études ont montré une augmentation de la sensibilité hépatique à l'insuline suite à l'entraînement en endurance lors de pathologies telles l'obésité et le diabète de type 2 (87, 192), peu d'études ont réussi à montrer ces mêmes changements lors d'une condition asymptomatique. De plus, une étude réalisée par Phillips et al. (156) n'a pas réussi à montrer une amélioration de la sensibilité du foie à l'insuline suite à un entraînement en endurance de six semaines. Ainsi, d'autres facteurs que l'augmentation de la sensibilité à l'insuline sont responsables pour expliquer l'amélioration du contrôle de l'homéostasie glucidique lors de l'exercice .

L'entraînement en endurance entraîne également une diminution des concentrations plasmatiques d'adrénaline chez des sujets humains (80, 214). Par contre, nous ne savons pas encore quels sont les effets de l'entraînement en endurance sur la sensibilité du foie aux catécholamines. En utilisant un modèle de perfusion hépatique, Robert et al. (171) ont montré que l'administration d'épinéphrine n'augmentait pas la production hépatique de glucose chez des animaux entraînés ou sédentaires. Par contre, suite à une nuit de jeûne, il a été montré que les foies d'animaux entraînés sont nettement plus sensibles à la norépinéphrine que les foies d'animaux sédentaires (163). Évidemment, il existe des divergences dans les résultats expérimentaux en ce qui a trait à la sensibilité du foie aux agents ayant la capacité de stimuler la production hépatique de glucose suite à l'entraînement en endurance. Par contre, quand les effets des hormones contre-régulatrices à l'insuline et au glucose sont considérés, seul le glucagon semble être plus efficace que les catécholamines pour stimuler la production hépatique de glucose chez des animaux entraînés (163). Un des facteurs qui explique le meilleur maintien de l'homéostasie glucidique par le glucagon suite à un entraînement en endurance est une augmentation de la sensibilité du foie au glucagon.

Chez des sujets entraînés, Drouin et al (61) ont montré une production hépatique de glucose de 53% supérieure à celle des sujets sédentaires suite à l'administration de glucagon. Ces résultats sont les premiers à montrer une

augmentation de la sensibilité du foie au glucagon suite à un entraînement en endurance. Par la suite, ce même groupe de chercheurs a réussi à montrer que l'entraînement en endurance chez l'homme augmente la sensibilité de la glycogénolyse et de la gluconéogenèse au glucagon. En utilisant des animaux entraînés à la nage suite à un jeûne de 24 heures ou nourris *ad libitum*, ce même groupe de chercheurs a montré que l'administration de glucagon lors d'une perfusion hépatique augmente significativement la glycogénolyse et la gluconéogenèse en comparaison avec des animaux non-entraînés (62). Indirectement, ces résultats ont été corroborés par Podolin et al. (162). En utilisant des foies isolés de rats entraînés, ces derniers ont montré une augmentation de la gluconéogenèse suite à l'incubation de tranches de foies en présence de lactate et de glucagon. Par contre, l'entraînement en endurance ne semble pas être l'unique facteur pouvant augmenter la sensibilité du foie au glucagon. En effet, Bonjorn-Matas et al. (129) ont montré une production hépatique de glucose supérieure chez des animaux soumis à une séance d'une heure d'exercice en endurance comparativement à des animaux demeurés au repos lors d'un clamp hyperglucagonémique. Ainsi, l'ensemble de ces résultats laisse croire à une augmentation de la sensibilité du foie au glucagon suite à l'entraînement et à une session d'exercice en endurance

1.6.1. Le récepteur au glucagon et l'entraînement en endurance

Pour expliquer l'augmentation de la sensibilité hépatique au glucagon suite à l'entraînement en endurance, Lavoie et al. (112, 113) ont formulé l'hypothèse que des changements dans les caractéristiques physiques du RG (B_{max}) ainsi que des modifications dans la capacité de liaison (K_d) du glucagon pour son récepteur expliqueraient les variations de la sensibilité hormonale du récepteur. L'analyse des membranes plasmiques d'animaux soumis à un entraînement en endurance à la nage de huit semaines révèle une augmentation du nombre de récepteurs au glucagon (B_{max}) sans modifications dans la capacité de liaison du glucagon pour son récepteur (K_d). Par contre, contrairement à Lavoie et al. (112, 113), Podolin et al. (161) ont remarqué une augmentation de l'affinité du glucagon pour son récepteur sans aucun changement dans le nombre de RG chez des rats soumis à un

entraînement en endurance à la course de 10 semaines. Bien que ces études montrent des résultats différents, il demeure évident qu'il se produit des modifications dans la sensibilité hépatique au glucagon suite à l'entraînement en endurance. La nature des modifications de la sensibilité hépatique au glucagon et les mécanismes inhérents à ces adaptations cellulaires restent à être élucidés.

Au niveau cellulaire, il est montré que suite à une stimulation au glucagon, les membranes plasmiques de rats entraînés ont une plus grande activation de l'adénylate cyclase comparativement aux rats sédentaires (142). Cette augmentation de l'activation de l'adénylate cyclase est observée pour différentes concentrations de glucagon : il est alors suggéré, mais non prouvé par les auteurs, que l'augmentation du nombre de récepteurs explique l'activation de l'AC malgré de faibles concentrations de l'hormone pancréatique. Plus récemment, il a été montré que l'entraînement en endurance permet le rétablissement de l'activité hépatique de l'adénylate cyclase chez des rats vieillissants : ce rétablissement de l'activité de l'AC s'effectue par une amélioration du ratio protéines G stimulantes/protéines G inhibitrices (161). Bien que les modifications engendrées au niveau du RG suite à l'entraînement en endurance ne sont pas encore élucidées, il est justifié de croire qu'une augmentation du nombre de RG et une augmentation de l'affinité du récepteur pour son ligand ainsi que des modifications post-réceptrices peuvent expliquer le maintien de la production hépatique de glucose malgré la diminution de la concentration plasmatique de glucagon. De plus, cette combinaison d'adaptations membranaires et cellulaires suite à l'entraînement en endurance permet une plus grande augmentation de la production hépatique de glucose durant l'exercice.

1.7. Facteurs responsables des modifications du récepteur au glucagon

Il existe peu de renseignements dans la littérature concernant les facteurs responsables des modifications dans le nombre de récepteurs hépatiques au glucagon et de l'affinité de celui-ci pour son ligand. Toutefois, parmi les facteurs connus pouvant moduler l'affinité et le nombre de RG, aucun n'est directement relié à l'entraînement en endurance. Des changements dans les concentrations de glucagon, dans l'oxygène portal, d'AMPc dans le foie, de glucose plasmatique et de glycogène sont mis en cause pour expliquer les changements dans le nombre et l'affinité des RG (1, 3, 17, 28, 108, 165, 191). Des changements dans le nombre de récepteurs hépatiques au glucagon sont remarqués dans des conditions d'hyperglucagonémie et de jeûne (17, 28). Que l'hyperglucagonémie soit de courte ou de longue durée, il semble se produire une diminution de la capacité de liaison du glucagon sur son récepteur. Ainsi, les résultats provenant de ces études montrent que la désensibilisation homologue du récepteur hépatique au glucagon expliquerait la diminution du nombre des récepteurs au glucagon lors de l'hyperglucagonémie (17, 28)

Toutefois, le jeûne nécessite une régulation précise de l'insuline et du glucagon pour arriver à stimuler la production hépatique de glucose (41). Bien que le jeûne engendre des modifications dans l'affinité de l'insuline pour son récepteur (7, 8), peu d'informations sont disponibles en ce qui a trait à l'affinité du glucagon pour son récepteur hépatique. Melancon et coll. (résultats non publiés) ont observé une augmentation de près de 200% du nombre de récepteurs au glucagon chez des rats à jeun pendant 24 heures par rapport à des rats nourris *ad libitum*. En réalité, cette augmentation du nombre de RG est deux fois plus grande que l'augmentation observée suite à un entraînement en endurance (117). Si nous considérons les résultats de l'étude de Melancon et coll., l'augmentation du nombre de RG jumelée à une l'augmentation significative du ratio glucagon à l'insuline favoriserait l'activation de la gluconéogenèse, le principal responsable de l'augmentation de la production hépatique de glucose lors d'un jeûne (4, 5, 105, 154, 173). Bien que le jeûne, l'entraînement et l'exercice en endurance altèrent les propriétés des récepteurs hépatiques au glucagon, les mécanismes responsables de ces changements restent

encore inconnus. Parmi les mécanismes suggérés, on retrouve des modifications de la désensibilisation, de la resensibilisation et de la dégradation du récepteur à sept domaines transmembranaires (Section 1.5.). Cependant, la majorité de l'information sur le contrôle de l'expression du récepteur hépatique au glucagon provient d'études sur le contrôle de l'expression de l'ARN messenger de ce dernier.

1.8. Contrôle de l'expression du récepteur au glucagon

Le gène du RG contient un promoteur sur lequel un élément glucose est présent. Cela signifie que l'expression du gène pourrait être affecté par la glycémie et l'hyperglycémie. En effet, lorsque des hépatocytes isolés ont été placés en culture et incubés avec du glucose, l'expression du RG a augmenté de façon proportionnelle à la concentration de glucose (1). De plus, il a été montré que cette augmentation de l'expression de l'ARNm du RG est dépendante de la concentration de l'oxygène retrouvée dans le milieu d'incubation : plus la concentration approche la concentration de l'oxygène retrouvée au niveau des hépatocytes périportales, plus l'augmentation est significative (108). Au contraire, lorsque ces mêmes hépatocytes sont incubés en présence d'AMPC ou de doses croissantes de glucagon, l'expression diminue de façon inversement proportionnelle (1). En considérant l'ensemble des travaux sur le sujet, il est possible que certains substrats gluconéogéniques, trioses phosphates et métabolites du métabolisme du glucose puissent contrôler l'expression de l'ARNm du RG lors de l'exercice physique. Par contre, à ce jour, aucun de ces mécanismes n'a reçu l'attention nécessaire pour déterminer leur rôle respectif dans le contrôle de l'expression de l'ARNm du RG lors de l'entraînement ou suite à une session d'exercice en endurance.

L'expression de l'ARNm du récepteur hépatique au glucagon a également été mesurée lors d'un jeûne de courte durée. En utilisant des hépatocytes isolés provenant de rats nourris *ad libitum* et incubés pendant 24 heures en présence de glucose et de substrats gluconéogéniques, une augmentation des concentrations d'ARNm du RG est constatée (28). De plus, on observe que l'expression du RG augmente de façon proportionnelle à la concentration de glucose présente dans le milieu d'incubation. Ces observations corroborent celles d'Abrahamsen, réalisées quelques années plus tôt. Cependant, lorsque des hépatocytes *in vitro* subissent un jeûne de 48 heures et incubés en présence d'alanine, de dihydroxyacétone ou de glycérol, l'expression de l'ARNm n'augmente pas. Il semble que l'augmentation de glucagon lors d'un jeûne annule l'effet stimulateur du glucose et des substrats gluconéogéniques sur l'expression de l'ARNm du RG.

Il est important de retenir qu'au départ, la concentration de l'ARNm du RG dans les hépatocytes à jeûn étant très élevée (28, Melancon et al., résultats non publiés), elle pourrait inhiber toute autre augmentation dans son expression protéique. Il est proposé par Burcelin et al. que l'activité gluconéogénique hépatique durant le jeûne peut stimuler l'augmentation de l'ARNm des RG. Toutefois, comme pour l'exercice et l'entraînement en endurance, les mécanismes responsables de l'augmentation du nombre de récepteurs et l'expression de l'ARNm du récepteur lors d'un jeûne restent à être élucidés. Il est possible que des changements dans les mécanismes de désensibilisation et d'internalisation puissent fournir des réponses aux modifications observées au niveau du RG lors d'un jeûne.

1.9. Le glucagon et son récepteur dans diverses pathologies

1.9.1. Le diabète

Comme nous l'avons mentionné précédemment, l'insuline et le glucagon sont des régulateurs clés de l'homéostasie glucidique. Plus précisément, le ratio de ces deux hormones semble avoir un impact important sur le contrôle du métabolisme glucidique. Il est observé que les concentrations absolues de glucagon et le ratio glucagon-à-insuline sont souvent élevés dans différentes formes de diabète, et ce, tant chez l'homme que chez l'animal (28, 197, 198). Jumelé à l'augmentation de glucagon, le diabète est une pathologie associée au glucagonome, une tumeur dérivée des cellules alpha du pancréas qui a la capacité de sécréter du glucagon (36). En prenant en considération les changements hormonaux lors du diabète de type 2, il semble que l'hyperglucagonémie chronique est en partie responsable de l'augmentation de la production hépatique de glucose et de l'hyperglycémie (46). Toutefois, cette augmentation de la production hépatique de glucose est accompagnée d'une diminution du nombre de récepteurs au glucagon chez des sujets diabétiques. Malgré cette baisse de récepteurs, le glucagon a la capacité de maintenir et même d'augmenter la stimulation de l'AMPc (28). Ce phénomène s'explique par le fait que l'activation de l'adénylate cyclase par le glucagon nécessite seulement 20% du nombre de récepteurs totaux (18). Une diminution du nombre de récepteurs totaux peut donc ne pas affecter le mécanisme de signalisation du glucagon.

Chez des animaux et des sujets asymptomatiques, les concentrations plasmatiques d'insuline augmentent immédiatement après un repas tandis que les concentrations de glucagon diminuent (164). Cependant, chez des patients atteints du diabète de type 2, la sécrétion post-prandiale d'insuline est diminuée tandis que celle du glucagon est élevée. (11, 30, 111, 135). De telles anomalies dans la sécrétion d'insuline et de glucagon pourraient expliquer le développement de l'intolérance au glucose chez des sujets atteints du diabète de type 2 et se révéler des signes précurseurs de cette pathologie (2, 111). En supprimant l'hyperglucagonémie post-prandiale chez des patients atteints du diabète de type 2, Shah et al. rétablissent la glycémie et sont les premiers à démontrer la relation causale entre

l'hyperglucagonémie et l'hyperglycémie (178, 179). Des études sur des patients atteints du diabète de type 1 montrent que cette hyperglucagonémie post-prandiale contribue à l'intolérance au glucose (55). Bien que l'hyperglucagonémie induit une intolérance au glucose chez les patients diabétiques ainsi que chez des sujets normaux ayant des modifications dans la sécrétion d'insuline, elle ne produit pas les mêmes effets lorsque la sécrétion d'insuline est normale (178, 181, 196). En effet, lorsque la sécrétion d'insuline est normale, l'hyperglucagonémie résulte en une très faible augmentation de la production hépatique de glucose (178, 179). Donc, à elle seule, l'hyperglucagonémie n'est pas responsable de l'augmentation de la production hépatique de glucose lors du diabète.

L'ensemble des connaissances sur le diabète de type 1 ou 2 confère à l'hyperglucagonémie un rôle important dans le développement et le maintien de l'hyperglycémie uniquement lorsque la sécrétion d'insuline est retardée ou absente. En plus des effets épigéniques de l'hyperglucagonémie sur l'hyperglycémie, un polymorphisme génétique du RG est associé au diabète de type 2. En effet, une mutation hétérozygotique sur l'exon 2 du gène du RG qui entraîne une mutation de la glycine pour une sérine (Gly₄₀Ser) a été associée au diabète de type 2 chez certains individus de la population française (83). Ce récepteur mutant montre moins d'affinité pour le glucagon et produit moins d'AMPc suite à sa stimulation (83). Cependant, cette mutation dans le diabète n'a qu'un impact discutable car on ne la retrouve pas parmi toutes les populations étudiées (94, 182).

Le rôle du glucagon et de son récepteur dans le diabète a fait l'objet de peu d'études et rares sont celles qui ont identifié les mécanismes spécifiques qui engendrent des modifications dans le métabolisme du glucagon. Dans l'étude du développement de la résistance hépatique à l'insuline, il est indiscutable que les facteurs systémiques (lipides circulants) ainsi que l'accumulation des triglycérides dans le foie peuvent être impliqués dans la pathogenèse (27, 177). Toutefois, nous n'avons aucune information sur l'impact de ces facteurs sur le métabolisme hépatique du glucagon. L'utilisation du modèle de la SHNA induite par une diète riche en lipides est très utile pour tenter d'élucider le rôle des lipides circulants et tissulaires sur la pathogenèse du diabète de type 2 et de l'insulino-résistance (42). Il

est donc justifié d'utiliser ce modèle de SHNA induite par une diète riche en lipides pour déterminer l'impact des lipides circulants et tissulaires sur le métabolisme hépatique du glucagon.

1.9.2. La stéatose hépatique non-alcoolique

La stéatose hépatique est une condition histopathologique caractérisée par une accumulation excessive de lipides dans les hépatocytes. Bien que différents types de lipides peuvent s'accumuler dans le foie, les triglycérides semblent être responsables du développement de la stéatose hépatique (29). Histologiquement, la stéatose hépatique peut être classée en stéatose microvésiculaire ou macrovésiculaire.

La stéatose microvésiculaire est le résultat d'une accumulation de vésicules lipidiques dans le cytoplasme. On observe ce type de stéatose dans diverses conditions génétiques et maladies : une condition métabolique congénitale, le syndrome de Reye et une réaction hépatotoxique aux drogues et aux toxines. Toutes ces conditions semblent présenter une déficience de la bêta oxydation mitochondriale (29).

D'autre part, la stéatose hépatique macrovésiculaire est observée dans différentes physiopathologies de nature nutritionnelle et métabolique. Bien que ce type de stéatose est souvent relié à l'alcoolisme ou à l'abus de drogues, elle est fréquemment diagnostiquée chez les patients atteints d'obésité, du syndrome X, du diabète de type 2 et de malnutrition (kwashiorkor). De plus, l'étiopathologie de cette maladie semble être plurifactorielle.

1.9.2.1. Pathogenèse

Le foie joue un rôle crucial dans le métabolisme lipidique; il importe des acides gras libres, il synthétise, stocke et exporte des lipides et des lipoprotéines. Toutefois, des changements dans certains facteurs locaux et systémiques (i.e. la résistance à l'insuline) peuvent modifier l'équilibre entre l'importation (synthèse de lipides hépatiques) et l'exportation (oxydation, sécrétion de VLDL) de lipides

hépatiques et engendrer une accumulation de triglycérides hépatiques. Selon la littérature, suite à l'accumulation de triglycérides, le foie devient stéatosé et vulnérable à une « seconde attaque » causant une inflammation hépatocellulaire qui mène à la fibrose. Plusieurs facteurs responsables de cette seconde attaque (*second hit*) ont été identifiés : les adipocytokines, le stress oxydatif et les endotoxines. Le *second hit* favorise donc l'exacerbation de la résistance à l'insuline, l'augmentation du stress oxydatif et la détérioration des hépatocytes.

1.9.2.2 La résistance à l'insuline dans le développement de la SHNA

Une combinaison de facteurs génétiques et acquis contribue à une première attaque sur le foie. Cette première attaque se caractérise par une augmentation de la lipolyse et l'exportation d'acides gras libres des adipocytes au foie. Dans ce cas, la résistance à l'insuline joue donc un rôle central. Chez des patients atteints du d'obésité et souffrant du diabète de type 2, il a été démontré qu'une relation presque parfaite (98%) existe entre la SHNA et la résistance à l'insuline (42, 148). Or la résistance à l'insuline au niveau adipocytaire semble altérer les mécanismes d'estérification et de dégradation des triglycérides. En dépit de l'hyperinsulinémie, la résistance à l'insuline augmente la lipolyse adipocytaire tout en diminuant l'estérification adipocytaire des triglycérides à partir des acides gras libre circulants (AGL). La conséquence de cet état est une augmentation de la concentration plasmatique d'AGL.

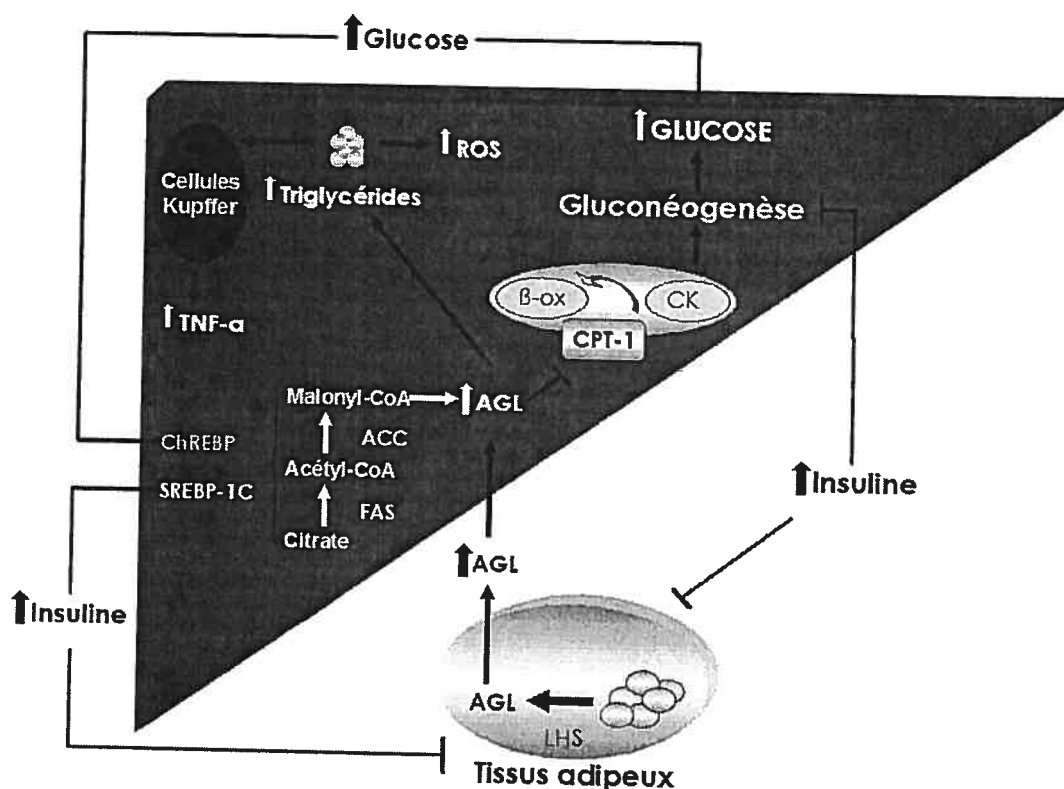


Figure 7 : Changements métaboliques résultants de l'accumulation de triglycérides hépatiques lors de la résistance à l'insuline. ACC : Acétyl-CoA carboxylase; AGL : Acides gras libres; β-OX : Béta oxydation; ChREBP : *Carbohydrate response element-binding protein*; CK : Cycle de krebs; CPT-1 : carnitine-palmitate transférase; FAS : *Fatty Acid Synthase*; LHS : Lipase hormono-sensible; ROS : *Reactive oxygen species*; SREBP-1C : *sterol regulatory element-binding protein-1*; TNF-α : *Tumor necrosis factor-1*. Sur la gluconéogenèse, l'insuline perd son action inhibitrice sur certaines enzymes (voir texte)

L'augmentation d'AGL circulants est tamponnée par le foie. Au niveau hépatique, les AGL sont ré-estérifiés en triglycérides plutôt qu'oxydés par la bêta oxydation. En plus d'avoir des effets délétères sur les adipocytes, la résistance à l'insuline engendre des modifications dans les mécanismes d'oxydation et d'estérification des acides gras libres hépatiques. La résistance à l'insuline joue donc un rôle prépondérant dans l'altération du métabolisme des lipides hépatiques (Figure 7).

Tout d'abord, l'insuline est reconnue pour inhiber l'oxydation mitochondriale des acides gras libres en favorisant la lipogenèse de novo selon diverses voies de contrôle : en stimulant l'acétyl-CoA carboxylase (ACC), l'insuline permet la transformation de l'acétyl-CoA en malonyl-CoA. Or, le

malonyl-CoA, une fois synthétisé, se transformera en triglycérides, produit final de la lipogenèse. Parallèlement, l'insuline inhibe la bêta oxydation en diminuant l'action de la carnitine-palmitate transférase (CPT1). Ainsi, en plus de stimuler la formation de malonyl-CoA grâce à l'action de l'ACC et de diminuer l'activité de la CPT-1 au niveau mitochondrial, l'hyperinsulinémie diminue significativement l'oxydation des AGL en plus d'augmenter la synthèse de triglycérides. Conséquemment, on constate le développement de la SHNA (Figure 7).

Deuxièmement, on sait que l'insuline inhibe et stimule certains facteurs transcriptionnels impliqués dans l'oxydation et l'estérification des acides gras libres au niveau hépatique. Il est prouvé que l'insuline inhibe temporairement le *forkhead transcriptional factor* (FOXa2) chez des souris normales tandis que l'hyperinsulinémie inactive totalement ce facteur transcriptionnel. Le FOX2a, une fois inhibé, semble augmenter la concentration de triglycérides plasmatiques, diminuer la bêta oxydation et augmenter la néoglucogenèse en plus de diminuer la sensibilité hépatique à l'insuline (215). De plus, l'hyperinsulinémie augmente l'activité de facteurs transcriptionnels lipogéniques des *peroxisome proliferator-activated receptor-gamma* (PPAR γ). Les PPAR γ , au niveau hépatique, sont considérés comme des facteurs transcriptionnels «potentiellement» importants dans l'induction de la stéatose hépatique car ils régulent la lipogenèse de novo. Il semblerait que l'augmentation de l'activité des PPAR γ par l'hyperinsulinémie a pour conséquence de stimuler parallèlement les SREBP-1C (*sterol regulatory element-binding protein-1*) et les FAS (*Fatty Acid Synthase*). SREBP-1C active plusieurs gènes impliqués dans l'estérification des acides gras libres dans le foie (92) en plus de stimuler les FAS, impliqués dans la transformation de l'acétyl-CoA et du malonyl-CoA en triglycérides (79). L'inactivation des FOXa2 et l'activation des PPAR γ exacerbent donc la condition pathologique de la SHNA.

L'augmentation de la présence d'acides gras libres au niveau du foie entraîne la hausse de la peroxydation lipidique. Chez des sujets atteints d'une SHNA, la présence de lipides peroxydés et de leurs métabolites proinflammatoires et profibrosiques hépatiques explique les anomalies histopathologiques observées. L'accumulation de triglycérides hépatiques

entraîne donc une augmentation des dysfonctions mitochondriales (68). Or, ces dysfonctions mitochondriales sont généralement associées avec une augmentation de la génération des espèces réactives (ROS). L'explication de ce phénomène semble être liée aux dommages causés suite au développement de la résistance à l'insuline. Des composés de la chaîne respiratoire sont réduits par les électrons qui, par la suite, réagissent anormalement avec l'oxygène pour former des espèces réactives (68). Simultanément, ces espèces réactives oxydent les triglycérides présents dans le foie et libèrent des produits de la peroxydation lipidique qui ont des effets délétères sur les hépatocytes. Dans les hépatocytes, les espèces réactives et les produits de la peroxydation lipidiques aggravent davantage les dommages à la chaîne respiratoire. Ceci, en retour, mène à la fabrication d'autres espèces réactives et à l'activation d'un cercle vicieux. Ainsi, les dysfonctions mitochondriales peuvent mener à l'apoptose ou à la nécrose cellulaire pour finalement activer les cellules stellaires et causer une fibrose hépatique.

1.9.2.3. Adipocytokines et stéatose hépatique non-alcoolique

Jusqu'à maintenant, l'augmentation des acides gras libres plasmatiques et hépatiques ainsi que les dysfonctions mitochondriales et la résistance à l'insuline sont impliquées dans le développement de la SHNA. Dans l'étiologie de la SHNA, il faut également considérer le rôle des adipocytokines.

La génération d'espèces réactives et la peroxydation lipidique - dont nous avons discuté lors de la section précédente - favorise la libération de cytokines (TNF- α , TGF- β , IL-8, INF- γ , etc.) qui jouent un rôle dans la pathogenèse de la SHNA. Cette physiopathologie semble significativement augmenter l'expression de TNF- α (153). Or, en plus de favoriser le développement de la résistance à l'insuline, le TNF- α participe aussi aux processus inflammatoires du foie (68). Curieusement, cette cytokine ne provient pas uniquement des adipocytes : le TNF- α peut aussi être sécrété par les cellules de Kupffer.

Les effets du TNF- α sur le foie sont nombreux. Dans la même cellule, la cytokine peut activer des voies de signalisation apoptotiques et nécrotiques

(apoptotiques) tout en favorisant la production de cytokines secondaires (167). Par exemple, l'activation du NF κ B par les TNF- α via les IKK β , stimule la phosphorylation des résidus sérine de l'IRS-1 en plus d'activer des voies de signalisation apoptotiques. Ainsi, en plus d'exacerber la résistance à l'insuline, le TNF- α est impliqué dans la détérioration cellulaire hépatique.

1.9.2.4. La stéatose hépatique non-alcoolique et le glucagon

Récemment, la découverte d'une relation causale entre le développement de la résistance hépatique à l'insuline et l'accumulation de triglycérides hépatiques a suscité un engouement pour l'étude des causes et conséquences de l'infiltration hépatique de lipides (176). Au niveau hépatique, il a été montré que la résistance à l'insuline résultante d'une diète riche en lipides provoque des modifications dans la production hépatique de glucose (97, 176). Par contre, peu d'études ont tenté de vérifier si la production hépatique de glucose est affectée par des changements dans la sensibilité hépatique du glucagon lors d'une SHNA. Étant donné que le glucagon représente le principal régulateur de la production hépatique de glucose avec l'insuline, il est primordial de déterminer si l'action du glucagon est altérée lors d'une infiltration de lipides hépatiques.

Une résistance hépatique au glucagon a été observée dans des conditions pathologiques comme le diabète (17), la cirrhose du foie (26) et la malnutrition (169). Une diminution de l'affinité du RG pour son ligand fut observée chez des rats hyperglucagonémiques atteints du diabète (17). De plus, chez des patients atteints d'une cirrhose du foie, une condition semblable est observée et ce, sans changements dans les concentrations de glycogène hépatique, d'insuline et de glucagon (26). Lors d'une infusion hyperglucagonémique à des rats malnourris, une diminution de la production hépatique de glucose fut observée contrairement à des rats nourris *ad libitum*. Bien que les raisons permettant d'expliquer ces diminutions de la sensibilité du foie au glucagon tardent à venir, aucune de ces études n'a adressé la problématique des lipides hépatiques.

Tel qu'expliqué à la section 1.5., il est possible que la sensibilité des récepteurs hépatiques au glucagon soit affectée par l'accumulation de triglycérides hépatiques. Par contre, les mécanismes responsables sont encore inconnus. Il a été montré que la résistance hépatique à l'insuline induite par une diète riche en lipides modifie la réponse des IRS-1 et IRS-2 en plus d'activer certains isoformes de la protéine kinase C (PKC). Or, l'activation des PKC par les lipides hépatiques, sous la forme de phospholipides, mène à la phosphorylation des GRK (50, 160). Comme nous l'avons précédemment indiqué, l'activation des GRK phosphoryle les RCPG et diminue ainsi la sensibilité pour leur ligand (114, 115, 116). Toutefois, nous ne savons pas si l'accumulation de triglycérides lors d'une SHNA peut mener à des changements dans la sensibilité hépatique au glucagon.

Pour palier aux effets délétères de la SHNA, de l'obésité et du diabète de type 2, il est recommandé de suivre une diète faible en lipides pour freiner l'infiltration hépatiques de lipides. Également, l'exercice physique est un moyen efficace pour minimiser la progression des effets secondaires reliés aux pathologies mentionnées.

1.10. La stéatose hépatique non-alcoolique et l'exercice physique

L'exercice chronique jumelé à une diète faible en lipides a longtemps été considéré comme un moyen efficace pour diminuer les effets délétères reliés à l'obésité et au diabète de type 2. Il demeure que ces deux méthodes d'intervention représentent encore les moyens les plus efficaces pour enrayer la progression de ces maladies. Des études antérieures ont montré que l'entraînement physique atténue le gain en adiposité, la détérioration du profil lipidique et le développement de la résistance à l'insuline lorsqu'on passait d'une diète standard à une diète riche en lipides (15, 106). Par contre, peu d'études ont tenté d'expliquer le rôle de l'exercice sur la prévention de l'infiltration de lipides hépatiques et comme agent curatif de la stéatose hépatique. Gauthier et al. (75) ont réussi à montrer qu'un programme d'entraînement en endurance de 8 semaines, jumelé à une diète riche en lipides, prévient l'apparition d'une stéatose hépatique macrovésiculaire. Auparavant, Naranyan et Rothfeld (140, 172) ont montré qu'un entraînement en endurance prévenait l'accumulation de lipides hépatiques lorsque des rats étaient soumis à une diète riche en lipides. Ainsi, il semble que l'exercice en endurance joue un rôle important dans la prévention du développement d'une SHNA.

Certaines études n'ont toutefois pas réussi à montrer un effet de l'entraînement en endurance sur la stéatose hépatique (195, 188). Une des raisons qui expliqueraient cette absence d'effets est que le programme d'exercice fut introduit lorsque la stéatose hépatique était déjà induite. Afin que l'entraînement en endurance soit efficace pour prévenir la stéatose hépatique, il doit débiter au même moment que le changement de diète (74).

Par contre, Gauthier et al. ont constaté que l'introduction d'un programme d'entraînement en endurance après huit semaines d'une diète riche en lipides permettait de réduire l'adiposité et les concentrations d'acides gras libres plasmatiques à des concentrations similaires à des groupes nourris selon une diète standard. Bien que l'entraînement en endurance ne parvienne pas à modifier les concentrations de triglycérides hépatiques, il permet de diminuer les effets délétères de la SHNA malgré son introduction après huit semaines d'une diète riche en lipides

(74). De plus amples informations sont nécessaires pour déterminer quels types d'exercices et modalités d'entraînement (volume et intensité) sont requis pour diminuer les concentrations hépatiques de triglycérides lors d'une SHNA.

À ce jour, aucune étude a tenté de vérifier les effets de l'entraînement en endurance sur la sensibilité hépatique du glucagon lors d'une SHNA.

Chapitre 2
PRÉSENTATION DE LA THÈSE

2. Présentation de la thèse

2.1. Objectifs de la thèse

En 2001, Saltiel et al (176) ont montré que l'accumulation de triglycérides hépatiques est un facteur important dans le développement de la résistance à l'insuline. Par la suite, de nombreuses études ont tenté d'élucider les causes et les conséquences de l'infiltration hépatique de lipides. Nonobstant le développement de la résistance à l'insuline, il est maintenant accepté qu'une augmentation de triglycérides hépatiques provoque également une augmentation de la production hépatique de glucose. Bien que les raisons expliquant ces adaptations métaboliques sont nombreuses, peu d'études ont tenté de vérifier si l'accumulation hépatique de lipides engendre des modifications dans la sensibilité du récepteur hépatique au glucagon.

Des changements dans la sensibilité hépatique au glucagon modifieraient l'homéostasie glucidique et, peut-être, joueraient un rôle important dans le développement de l'hyperglycémie, l'hyperinsulinémie et la résistance à l'insuline observées lors de physiopathologies comme le diabète de type 2, l'obésité et la SHNA. Une diminution de la sensibilité du foie au glucagon a précédemment été montrée chez des patients atteints de diabète, d'une cirrhose du foie et de malnutrition, mais les raisons de cette baisse de sensibilité demeurent inconnues. Il est donc fondamental de bien comprendre les mécanismes régulateurs de la sensibilité du foie au glucagon lors d'une infiltration hépatique de lipides.

Il a été clairement montré que l'entraînement et l'exercice en endurance ont la capacité d'augmenter la sensibilité du foie au glucagon lors d'une condition asymptomatique. Toutefois, aucune information n'est disponible en ce qui a trait à l'impact de l'exercice physique sur la sensibilité du foie au glucagon lors d'une SHNA. Ainsi, dans un but thérapeutique, il est de première importance de déterminer le rôle de l'entraînement et de l'exercice physique en endurance sur la sensibilité du foie au glucagon lors d'une SHNA.

Les objectifs de la présente thèse se divisent donc en quatre volets:

- 1) Étudier les effets d'une infiltration hépatique de lipides sur la production hépatique de glucose induite par un clamp hyperglucagonémique.
- 2) Déterminer les changements de la densité et de l'affinité du RG ainsi que les modifications apportés sur les protéines G stimulantes et inhibitrices hépatiques lors d'une SHNA.
- 3) Comprendre et éclaircir la désensibilisation du RG lors d'une SHNA.
- 4) Déterminer le rôle de l'entraînement et de l'exercice physique en endurance sur la sensibilité du foie au glucagon ainsi que sur le phénomène de désensibilisation lors d'une SHNA.

2.2. Introduction aux manuscrits

Cette thèse présente trois manuscrits qui contribuent à l'avancement des connaissances sur la sensibilité hépatique au glucagon lors de la SHNA. Elle permet d'éclaircir le rôle de l'entraînement et de l'exercice physique en endurance sur la sensibilité hépatique au glucagon lors de cette physiopathologie. Cette section offre une brève introduction à chacun des manuscrits, en plus de donner un court résumé de chacun. Le rôle de l'auteur et des co-auteurs dans l'élaboration des projets ainsi que dans la rédaction des manuscrits sera décrite. Toutes les études présentées dans cette thèse ont été subventionnées par Jean-Marc Lavoie grâce au Conseil de Recherches en Sciences Naturelles et en Génie du Canada (CRSNG).

ÉTUDE 1 : *Evidence of Hepatic Glucagon Resistance Associated with Hepatic Steatosis : Reversal Effect of Training*

Cette première étude se veut une suite à l'étude élaborée par Bonjorn-Matas et al. (129) en 1999. Dans cette étude, il a été montré que la sensibilité hépatique au glucagon augmente après 60 minutes d'exercice en endurance sur tapis roulant. Précédemment, il a été montré, grâce aux travaux du groupe de recherche de Carole Lavoie de l'Université du Québec à Trois-Rivières, que l'entraînement en endurance peut également augmenter la sensibilité hépatique au glucagon.

Parallèlement à l'étude du métabolisme du glucagon, le Dr Jean-Marc Lavoie étudie le développement de la stéatose hépatique induite par une diète riche en lipides et du rôle de l'entraînement en endurance sur le développement de cette pathologie. Dans un souci de consolider l'ensemble des connaissances, le Dr Lavoie me suggère un projet qui vise à vérifier les effets de la SHNA sur le métabolisme hépatique du glucagon ainsi que le rôle de l'entraînement en endurance sur la sensibilité hépatique au glucagon.

Pour ce faire, nous avons soumis des rates Sprague Dawley à une diète standard (SD) ou riche en lipides (HF) pour une durée de huit semaines. Certains groupes expérimentaux ont aussi été soumis à un entraînement en endurance de six semaines sur tapis roulant pour vérifier les effets de l'entraînement sur le métabolisme du glucagon (SD-Tr et HF-Tr). À la fin des traitements expérimentaux, les rates ont été soumises à un clamp hyperglucagonémique d'une durée de 60 minutes avec glucose tritié pour calculer la production hépatique de glucose. Les résultats expérimentaux montrent que la production hépatique de glucose des rates soumises à une diète riche en lipides n'ayant pas subi un entraînement en endurance (HF-Sed) est significativement inférieure à la production hépatique de glucose des rates soumises à une diète standard (SD-Tr). L'entraînement en endurance parvient à augmenter la production hépatique de glucose des rates soumises à une diète riche en lipides (HF-Tr). Ainsi, 1) une diminution de la sensibilité hépatique au glucagon est observée chez des rates soumises à une diète riche en lipides et 2) une augmentation de la sensibilité hépatique au glucagon est observée chez des rates soumises à une diète riche en lipides de huit semaines et un entraînement en endurance sur tapis roulant de six semaines. Un résultat important issu de cette première étude est la relation entre l'accumulation de triglycérides hépatiques et la diminution de la production hépatique de glucose ($R = -0,849$, $P < 0,001$).

Lors de ce projet, je fus responsable de l'élaboration des hypothèses de recherche, du choix du modèle expérimental, de la collecte de données, de l'analyse et de l'interprétation des résultats ainsi que de la rédaction du manuscrit. Pour ce qui est de la rédaction du manuscrit, le Dr Jean-Marc Lavoie m'a offert une aide

précieuse. La technique du clamp hyperglucagonémique et la chirurgie nécessaire pour implanter les canules carotidiennes et jugulaires m'ont été enseignées par Karine Couturier et Marie-Soleil Gauthier. Amélie Paquette, Pascal Collin, Patrick Brault et Siham Yasari m'ont offert leur aide dans la collecte de données et pour l'entraînement des rats.

ÉTUDE 2: *Alterations in Hepatic Glucagon Receptor Density, and in $G_{s\alpha}$ and $G_{i\alpha 2}$ Protein Content with Diet-Induced Hepatic Steatosis: Effects of Acute Exercise*

Suite aux résultats expérimentaux obtenus lors de l'étude précédente, nous voulions élucider les mécanismes responsables des modifications de la sensibilité hépatique au glucagon lors d'une SHNA induite par une diète riche en lipides. Pour ce faire, nous avons mesuré le nombre (B_{max}) et l'affinité (K_d) des récepteurs au glucagon grâce à une technique de radioliation. De plus, nous avons analysé le contenu membranaire en protéines G des hépatocytes pour vérifier si les changements dans la sensibilité hépatique du glucagon lors d'une SHNA sont également le résultat de changements dans le contenu membranaire en protéines G stimulantes ($G_{s\alpha}$) et inhibitrices ($G_{i\alpha 2}$) hépatiques. Dans cette étude, nous avons choisi une période d'exercice physique en endurance de 30 minutes pour stimuler de façon physiologique les récepteurs au glucagon.

Des rates de même souche que l'étude précédente ont été utilisées pour les fins de ce projet. Par contre, nous avons soumis les animaux à deux semaines de diète standard (SD) ou riche en lipides (HF) à cause des résultats obtenus lors de l'étude de Gauthier et al. (74) : ces derniers ont montré que le foie a une quantité maximale de triglycérides après 14 jours d'une diète riche en lipides. Ainsi, comme nous voulions mettre en relation la quantité de lipides hépatiques et la perte de sensibilité du foie au glucagon, nous avons opté pour ce temps de traitement en raison de l'entreposage maximal de triglycérides. Un groupe de rates dans chaque condition alimentaire a été soumis à un exercice en endurance de trente minutes avant leur sacrifice (HF-Ex, SD-Ex). À défaut d'utiliser le modèle de stimulation supraphysiologique au glucagon de la précédente étude, nous avons opté pour

l'exercice aigu pour stimuler de façon physiologique les récepteurs au glucagon. Les groupes laissés au repos représentaient des conditions de contrôle (HF-Rest, SD-Rest). Une diminution significative du nombre de récepteurs au glucagon (B_{max}) sans changement de leur affinité (K_d) fut observée lors d'une SHNA induite par une diète riche en lipides. De plus, une relation causale entre l'augmentation du contenu hépatique en triglycérides et la diminution du nombre de RG fut démontrée ($R = -0,512$, $P < 0,003$). Une diminution significative du ratio protéines G stimulantes sur protéines G inhibitrices ($G_{s\alpha}/G_{i\alpha 2}$) fut également observée chez les animaux stéatosés. Même si l'exercice physique en endurance n'affecte pas le nombre et l'affinité des RG et le ratio $G_{s\alpha}/G_{i\alpha 2}$, les résultats de cette étude expliquent en partie les résultats de la précédente étude : la diminution de la production hépatique de glucose induite par le glucagon chez des rats atteints d'une stéatose hépatique causée par une diète riche en lipides s'explique par une diminution du nombre de récepteurs présents à la membrane ainsi qu'une diminution dans le contenu protéique du système de signalisation intracellulaire spécifique au glucagon (G_s/G_i).

Lors de ce projet, je fus une fois de plus responsable de l'élaboration des hypothèses de recherche, du choix du modèle expérimental, de la collecte de données de l'analyse et de l'interprétation des résultats ainsi que de la rédaction du manuscrit. Pour une seconde fois, le Dr Jean-Marc Lavoie m'a offert son aide précieuse dans la rédaction et la correction du manuscrit. Alexandre Melancon et Carole Lavoie de l'Université du Québec à Trois-Rivières m'ont prêté main forte dans l'analyse du nombre et de l'affinité des récepteurs hépatiques au glucagon. Pierre Corriveau, biochimiste du département de kinésiologie de l'Université de Montréal, m'a aidé à mettre au point les techniques d'isolation de membranes plasmiques d'hépatocytes et d'immuno buvardage pour quantifier le contenu en protéines G stimulantes et inhibitrices.

ÉTUDE 3: *Hepatic Glucagon Receptor Internalization Associated with Diet-Induced Hepatic Steatosis.*

La diminution du nombre de récepteurs membranaires au glucagon observée lors de notre seconde étude offre une piste d'explication pour la diminution de la production hépatique de glucose induite par le glucagon lors de notre première étude. Toutefois, la motivation principale de cette troisième étude était de déterminer le devenir cellulaire des récepteurs hépatiques au glucagon lors d'une SHNA. Plus précisément, nous voulions vérifier si le nombre total de RG est modifié lors d'une SHNA. Nous voulions également vérifier si une désensibilisation ou une internalisation des récepteurs hépatiques au glucagon survient lors d'une telle pathologie. Dans cette étude, le temps d'exercice physique en endurance est de 60 minutes pour stimuler physiologiquement les récepteurs au glucagon.

Des rats Sprague-Dawley ont été soumis aux mêmes particularités méthodologiques de l'étude précédente. Par contre, l'absence d'effets de l'exercice dans la précédente étude nous a obligé à doubler le temps d'effort à 60 minutes. Après deux semaines de traitement alimentaire, deux groupes de rats (SD-Ex, HF-Ex) ont été soumis à 60 minutes d'exercice en endurance pour stimuler les récepteurs au glucagon tandis que les deux autres groupes (SD-Rest, HF-Rest) sont restés au repos. Par la suite, une perfusion hépatique à la collagénase fut pratiquée pour isoler les hépatocytes. En utilisant une technique d'immunofluorescence, les hépatocytes ont ensuite été incubés en présence d'un premier anticorps spécifique pour le récepteur hépatique au glucagon (ST-18). L'utilisation d'un second anticorps fluorescent nous a permis de visualiser tous les récepteurs au glucagon présents dans les hépatocytes. De plus, nous avons isolé les membranes plasmiques, les endosomes et les lysosomes hépatiques pour en arriver à faire de l'immunobuvardage contre les récepteurs au glucagon avec l'anticorps ST-18. Il nous a ainsi été possible de vérifier la présence de récepteurs au glucagon dans les différentes organelles impliquées dans le processus de désensibilisation et d'internalisation des RCPG. Une diminution du nombre total de récepteurs hépatiques au glucagon fut observée chez les rats soumis à une diète riche en lipides, sans changements avec l'exercice. De plus, une diminution du nombre de récepteurs membranaires au glucagon fut

observée chez les rats stéatosés. Pour ce qui est des organelles microvésiculaires, une augmentation du nombre de récepteurs endosomaux et lysosomaux au glucagon fut détectée chez les rats soumis à une diète riche en lipides. Ainsi, en plus d'une internalisation des récepteurs hépatiques au glucagon, on constate une désensibilisation de type hétérologue lors d'une SHNA. Les mécanismes responsables de cette désensibilisation demeurent toutefois inconnus.

Une fois de plus, je fus responsable de l'élaboration des hypothèses de recherche, du choix du modèle expérimental, de la collecte de données de l'analyse et de l'interprétation des résultats ainsi que de la rédaction du manuscrit. La Dr Cecilia G. Unson (49, 102, 133, 199, 200) de l'Université Rockefeller de New York nous a gracieusement fourni l'anticorps spécifique au RG (ST-18) et son expertise pour la technique d'immunofluorescence. Pour une troisième fois, le Dr Jean-Marc Lavoie m'a offert son aide précieuse dans la rédaction et la correction du manuscrit. Pierre « Sweet Pete » Corriveau, m'a, une fois de plus, aidé dans la mise au point méthodologique.

Chapitre 3

Manuscrit 1

Titre

Evidence of Hepatic Glucagon Resistance Associated with Hepatic Steatosis : Reversal Effect of Training

Auteurs

Alexandre Charbonneau, Karine Couturier, Marie-Soleil Gauthier et Jean-Marc Lavoie

Journal

International Journal of Sports Medicine, Jul-Aug;26(6):432-41, 2005.

SOMMAIRE

La présente étude a comme objectif de vérifier les hypothèses 1) qu'une SHNA induite par une diète riche en lipides diminue la production hépatique de glucose (PHG) induite par un clamp hyperglucagonémique et 2) qu'un programme d'entraînement en endurance peut prévenir la perte de sensibilité du foie au glucagon occasionnée par la SHNA. Pour une durée de huit semaines, deux groupes de rats sont nourris avec une diète standard (SD) tandis que deux autres groupes sont nourris avec une diète riche en lipides (HF; 42% kcal). Dans les deux traitements alimentaires, un groupe de rat reste sédentaire pour la durée de l'expérience (Sed) tandis qu'un second groupe est entraîné sur tapis roulant (TR) pour une durée totale de six semaines. L'entraînement en endurance débute deux semaines après le début de la diète et l'intensité augmente progressivement pour atteindre un maximum de 60 minutes d'entraînement à 26 m/min avec 10% d'inclinaison lors des trois dernières semaines. La PHG est mesurée chez quatre groupes de rats anesthésiés recevant une infusion constante de glucagon (2 ug/kg/min i.v.) pour une période de 60 minutes. Une augmentation de ~ 28% ($P < 0.01$) dans les concentrations de triglycérides hépatiques est observée chez les rats Sed soumis à une diète HF en comparaison avec les rats nourris à la SD. L'entraînement en endurance des rats soumis à une HF prévient cette augmentation de la concentration des lipides hépatiques. Les concentrations plasmatiques de glucagon (~90 000 pg/ml) et d'insuline (~500 pmol/l) augmentent à des concentrations semblables dans les quatre groupes à l'exception de celle de l'insuline dans le groupe SD-Sed qui est significativement plus élevée ($P < 0.05$). L'hyperglycémie (~ 300 mg/dl) induite par l'infusion de glucagon est significativement supérieure ($P < 0.05$) dans le groupe SD-Sed que les groupes HF-Sed et SD-TR. L'infusion de glucagon provoque une plus faible augmentation (~ 35%) de la PHG dans le groupe HF-Sed comparativement au groupe SD-Sed. Cette plus faible PHG est observée après 25, 40 et 60 min d'infusion. L'entraînement en endurance chez les rats nourris à une diète HF permet d'atténuer significativement (50%; $P < 0.05$) l'état de résistance hépatique au glucagon. Lorsque les concentrations individuelles de triglycérides hépatiques sont

comparées aux valeurs de PHG après 60 min d'infusion de glucagon, une relation causale est observée entre l'augmentation de lipides hépatiques et la diminution de l'action du glucagon sur le foie ($R = -0.849$, $P < 0.001$). Cette étude est la première à montrer qu'une résistance hépatique au glucagon se développe suite à l'ingestion d'une diète riche en lipides et que l'entraînement en endurance atténue cette perte de sensibilité. Nous croyons que l'infiltration de lipides au niveau hépatique interfère avec l'action du glucagon causant ainsi une résistance au glucagon.

Mots clés: infusion de glucagon; production hépatique de glucose; infiltration lipidique; foie

SUMMARY

The present study was undertaken to test the hypothesis that a high-fat diet-induced hepatic steatosis is associated with a reduction in hepatic glucose production (HGP) in response to a hyperglucagonemic infusion, and that this postulated state of hepatic glucagon resistance in high-fat fed rats is attenuated by concurrent exercise training. HGP was measured in four groups of anesthetized rats infused with glucagon (2 $\mu\text{g/kg/min}$ iv) over a period of 60 min. Two groups of rats were either fed a standard (SD) or a high-fat (HF; 42% kcal) diet for eight weeks and were assigned either to a Sedentary (Sed) or a treadmill-trained (TR) group. Training was initiated two weeks after the beginning of the diet protocol and was progressively increased over a period of 6 weeks reaching 60 min at 26 m/min, 10% grade, for the last 3 weeks. The HF compared to the SD diet resulted in $\sim 28\%$ higher ($P < 0.01$) liver triglyceride levels in Sed rats. This increase was completely prevented by the exercise training program in the HF-TR group. Plasma glucagon ($\sim 90\,000$ pg/ml) and insulin (~ 500 pmol/l) levels were increased to a similar extent in all four groups, with the exception of higher ($P < 0.05$) insulin levels in SD-Sed group. Glucagon induced-hyperglycemia (~ 300 mg/dl) was higher ($P < 0.05$) in the SD-Sed than in HF-Sed and SD-TR groups. Glucagon infusion resulted in a significantly ($P < 0.05$) lower increase ($\sim 35\%$) in HGP in HF-Sed compared to SD-Sed group. The lower level of HGP in HF-Sed compared to SD-Sed rats was observed whether HGP was measured after 25, 40, or 60 min of glucagon infusion. Exercise training in HF fed rats resulted in a significant ($P < 0.05$) attenuation (50%) of the state of HF-induced glucagon resistance. Comparisons of all individual liver triglyceride and 60-min HGP values revealed that liver triglyceride values were highly ($P < 0.001$) predictive of the decreased glucagon action on HGP ($R = -0.849$). The present results indicate that the feeding of a high-fat diet induces a state of hepatic glucagon resistance, which is partially attenuated by concurrent exercise training. It is suggested that liver lipid infiltration may interfere with the action of glucagon, thus inducing glucagon resistance in liver.

Key words: glucagon infusion; hepatic glucose production; fat deposits; liver

INTRODUCTION

Increasing interest in the causes and consequences of liver lipid infiltration has been recently spurred by the finding of a relationship between the accumulation of triacylglycerol in tissues other than adipocytes and the development of a state of insulin resistance (28). In liver, insulin resistance associated with obesity in humans and with a HF diet in animals has been reported to disrupt normal hepatic glucose production (HGP; 16, 28). Whether HGP is also affected by a change in liver glucagon sensitivity following a high-fat diet is not known. The possible role of glucagon in physiopathologies such as obesity, diabetes and its associated hepatic lipid infiltration has been overlooked in past studies. Considering that glucagon is the primary regulator of hepatic glucose output, it is of interest to consider whether the specific action of glucagon in liver is hampered by a high-fat diet and hepatic lipid infiltration.

Fatty liver, or steatosis, refers to a histopathological condition characterized by an excess accumulation of lipids, primarily triacylglycerols, within hepatocytes (7). Although simple steatosis is not strictly a form of hepatitis, it is included as part of the broad spectrum of non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD; 2). Hepatic insulin resistance has recently been associated with fat accumulation in liver independent of obesity in men (29). There is no data, however, showing a possible link between liver lipid infiltration and hepatic glucagon resistance. Existence of such a link is supported by the demonstration of an hepatic resistance to glucagon action in cirrhotic patients that is not caused by reduced glycogen stores (6,24). The first aim of the present study was, therefore, to test the hypothesis that a high-fat diet-induced hepatic steatosis is associated with a reduction in glucagon-induced hepatic glucose production.

Recently, there has been one report suggesting that the liver of trained individuals was more sensitive to glucagon than the liver of untrained individuals (11). Subsequently, the same group of authors reported an increased density of glucagon receptors from endurance-trained rats (19). At the same time, Podolin et al. (25) observed an increased hepatic glucagon receptor-binding affinity with exercise training in old rats. These findings support the view that chronic exercise increases

the sensitivity of the liver to glucagon. In the perspective that glucagon sensitivity is reduced by a high-fat diet-induced liver lipid infiltration, it is of interest to determine if chronic endurance training improves hepatic glucagon sensitivity of steatotic rats. In support of this hypothesis, our group has recently provided evidence that exercise training reduces hepatic steatosis in HF fed rats (12). The second aim of the present study was to determine if chronic endurance training alters glucagon-mediated hepatic glucose production in liver of high-fat fed rats. Results indicate that HGP in HF-fed rats during hyperglucagonemic infusion was reduced by ~ 35% relative to control rats, this reduction being attenuated in endurance trained rats.

MATERIALS AND METHODS

Animal Care and exercise protocol. Female Sprague-Dawley rats (Charles River, St. Constant, Canada), weighing 200-220g, were housed in individual cages and allowed food (standard diet or high-fat diet) and water *ad libitum* for 8 weeks after they were received in our laboratory. The lighting schedule was such that lights were on from 0700 until 1900, and room temperature was maintained at 20-23°C. Two weeks following their arrival and the initiation of the specific diets, rats from trained groups began an exercise protocol consisting of continuous running on a motor-driven rodent treadmill (Quinton Instruments, Seattle, WA) 6 times/wk for 6 wk. Rats were progressively run for 15 min/day at 15 m/min, 0% slope, up to 60 min/day at 26 m/min, 10% slope, for the last 3 wk. All exercise trained animals were restrained from exercise 48h before the experimentation.

Groups and Surgery. After their arrival, rats were randomly assigned to one of the four experimental groups. One group of rats was fed with standard (SD) pellet rat chow (12.5% lipid, 62.3% carbohydrate, and 24.3 % protein (kcal); Agribrands Purina Canada, Woodstock, Ontario). A second group was fed with high-fat (HF) small pellets rat chow (42% lipids; 36% carbohydrate, and 22% protein (kcal); ICN Pharmaceuticals (NY, USA)). Details of the diets are described elsewhere (12). One-half of the animals in each dietary condition were concurrently exercise trained (TR) for 6 wks, whereas the other one-half remained Sedentary (Sed). Hence the four experimental groups consisted of SD-fed rats in the Sed (SD-Sed) or the TR state (SD-TR), or HF-fed rats in the Sed (HF-Sed) or the TR state (HF-TR), with $n = 8-10$ rats/group. On the morning of the experiment, any remaining food was removed from the cages 2-3h before sacrifice. Rats were weighed and anesthetized with pentobarbital sodium (40 mg/kg ip) as the whole experiment was conducted with the animals under anesthesia. All rats were implanted with two catheters into the right jugular vein for the respective infusions of glucagon and [$3\text{-}^3\text{H}$]glucose, and one into the carotid artery for blood sampling. All catheters were filled with sterile 0.9% NaCl. A small mid-abdominal incision (2 - 2.5 cm) was thereafter made to give free access to the liver. An open liver biopsy (~100 mg) was then taken according to

Daemen et al. (9). After the liver was exposed via the abdominal incision, a small piece of liver tissue (80 – 100 mg) was cut off the edge of the median lobe with a sharp scissor cooled to liquid nitrogen temperature. The use of a cooled scissor allowed almost no bleeding. After the biopsy, the abdomen was sutured. The whole surgery procedure lasted ~15 min and was followed by a 10 min recovery period before the beginning of the infusions. During the entire experiment, the body temperature of the animals was maintained by using a heating blanket.

Experimental protocol. After the surgical procedures described above, a 75 min period was allowed for tracer stabilization ($[3\text{-}^3\text{H}]\text{glucose}$). Blood samples were taken at 30 (500 μl), and 35 min (600 μl) of this period for the determination of basal plasma glucagon, insulin, free fatty acids (FFA), triglycerides, and glycerol concentrations. These basal values are reported under time 0 in the figures. This procedure was used to avoid sampling of large blood volume immediately before the beginning of the glucagon infusion. Arterial blood samples (250 μl) were also taken at times 60, 65, 70, and 75 min for the determination of the basal rate of glucose turnover. The tracer stabilization period was immediately followed by a 60 min period of glucagon infusion in all rats. For this, a primed (20 $\mu\text{g/kg}$ over 1 min) constant-rate (2 $\mu\text{g/kg/min}$) infusion of glucagon (from porcine pancreas: Sigma Aldrich Canada, Oakville, Canada) dissolved (20 $\mu\text{g/kg/ml}$) in diluting fluid (1.6 % glycerine and 0.2% phenol) with saline was delivered intravenously by a precision pump (Harvard Apparatus). This dose of glucagon was chosen to mimic the bolus dose used by Rao (27) to demonstrate that chronically malnourished rats were glucagon resistant in the liver. During the infusion period, 250 μl of arterial blood was sampled every 5 min for determination of glucose turnover. At 40 and 60 min, 1 ml of arterial blood was sampled for measurements of insulin, glucagon, FFA, triglycerides, and glycerol. For all blood samplings, red blood cells obtained from blood centrifuged without preservatives were resuspended in saline and reinjected into the animal. After the last blood sample was taken, the abdominal cavity was reopened and a piece of the median lobe of the liver was removed and frozen with aluminium block tongs cooled to liquid nitrogen temperature. Immediately after, visceral fat pads (mesenteric and retroperitoneal) were removed and immediately weighted. Mesenteric fat pad consisted of adipose tissue surrounding the gastro-

intestinal sphincter to the end of the rectum. Retroperitoneal fat pad was taken as that distinct deposit behind each kidney along the lumbar muscles.

Glucose Turnover. A primed (74 kBq) continuous infusion of [$3\text{-}^3\text{H}$]glucose (dissolved in ultra-pure water, 1.480 kBq/ml, >97% pure; New England Nuclear, Boston, MA) was delivered intravenously by a precision pump (Harvard Apparatus). The infusion rate of the tracer during the stabilization period was 2.457 kBq/min (-75 to 0 min). This rate was increased twofold to 4.914 kBq/min at the beginning of the glucagon infusion and maintained throughout the infusion period. This was done to keep the tracer specific activity as constant as possible. Glucose appearance was calculated by using the formula for non-steady state conditions developed by Steele (31) and validated by Radziuk et al. (26). The volume of distribution in which rapid changes in glucose concentration and specific activity of [$3\text{-}^3\text{H}$]glucose occur was set to 188 ml/kg body wt. Smoothing of glucose and specific activity values to reduce rapid changing of these variables with respect to time was conducted by an independent researcher using curve fitting by hand (1).

Analytical Methods. Blood was collected into 1-ml syringes with 7% EDTA. For the assay of [$3\text{-}^3\text{H}$]glucose radioactivity, 70 μl of plasma was deproteinized with 35 μl of 1N perchloric acid and centrifuged (17). Duplicate aliquots (30 μl) of the supernatant were evaporated overnight under a stream of air to remove tritiated water. The dry residue was redissolved in 200 μl of water and counted in 3 ml scintillation liquid (Sigma-Fluor, Sigma Chemical, St. Louis, MO) using a liquid scintillation spectrophotometer. Correction for counting efficiency was always carried out by means of dilutions of the infusate with plasma run in parallel with plasma samples (17). The fraction of blood (220 μl) to be used for glucagon determination was preserved in aprotinin (25 μl) before centrifugation. The remaining fraction of blood was also centrifuged (Eppendorf centrifuge, no. 5415), and the plasma was stored for subsequent insulin, glucose, triglycerides, free fatty acids, and glycerol determinations. All tissues and blood samples were stored at -78°C until analyses were performed.

Plasma glucose concentrations were determined by using a glucose analyser (Yellow Springs Instruments 2300, Yellow Springs, OH). Insulin and glucagon concentrations were determined by commercially available radioimmunoassay kits (Radioassay System Laboratory, ICN Biomedicals, Costa Mesa, CA; distributed by Immunocorp, Montréal, Québec, Canada). Plasma and liver triglycerides and glycerol concentrations were determined by quantitative enzymatic method (Sigma Diagnostics, St. Louis, MO). FFA concentrations were determined by enzymatic colorimetric assay (Roche Diagnostics, Laval, Québec, Canada). Liver glycogen concentrations were determined by using the phenolsulfuric acid reaction (21).

Statistical Analysis. All data are reported as means \pm SE. The total area under the concentration curve and above baseline for glucose, glucose production, insulin, glucagon, plasma triglycerides, glycerol, and FFA levels was computed by using a trapeizoidal model. Statistical comparisons were performed by using a two- and a one way ANOVA for repeated and nonrepeated-measures design, respectively. Fisher's post hoc test was used in the event of a significant ($P < 0.05$) F ratio.

RESULTS

There was no difference in body weight among groups at any measured point in time during the 8-wk experimental period (Table 1). Nevertheless, the high-fat compared to the standard diet resulted in a significantly ($P < 0.05$) higher relative weight of retroperitoneal fat deposit in the Sed state. Training resulted in significant ($P < 0.05$) lower levels of retroperitoneal and mesenteric fat deposits in both dietary conditions (Table 1).

The hyperglucagonemic infusion resulted in a significant ($P < 0.01$) decrease in plasma triglyceride levels in all groups (Fig. 1A). There was, however, no difference in the area under the plasma triglyceride curves among the four groups. Liver triglyceride concentrations, measured at the end of the glucagon infusion, were higher ($P < 0.01$) in the HF-Sed than in the SD-Sed group (Fig. 1B). Training significantly ($P < 0.05$) lowered hepatic triglyceride concentrations in HF but not in the SD fed rats. Plasma glycerol concentrations increased significantly ($P < 0.01$) and to a similar extent in all groups in response to the glucagon infusion (Fig. 2A). Despite an overall tendency to increase following the glucagon infusion, free fatty acid levels were not changed significantly ($P > 0.05$) during the course of the infusion and no inter-group differences were observed (Fig. 2B).

Pre- and post-glucagon infusion values of hepatic glycogen are shown in Fig 3. HF fed rats in the Sed state, had a lower hepatic glycogen concentration compared to their SD fed counterparts before the infusion protocol (Fig. 3A; $P < 0.05$). Pre-infusion hepatic glycogen concentration was also higher ($P < 0.05$) in HF-TR compared to HF-Sed. Glucagon infusion, resulted in a significant ($P < 0.01$) decrease in liver glycogen content in all groups (Fig. 3A). Hepatic glycogen breakdown following glucagon infusion was, however, significantly ($P < 0.05$) larger in the HF-Sed than in SD-Sed and HF-TR groups (Fig. 3B). There was no significant difference ($P > 0.05$) in glycogen breakdown between SD-Sed and SD-TR groups. Plasma glucose concentrations were significantly ($P < 0.01$) increased to hyperglycemic levels (~ 300 mg/dl) in all groups in response to the infusion of glucagon (Fig. 4A). For the whole 60 min period, the total area under the glucose concentration curve reveals significantly higher values in SD-Sed compared to HF-Sed animals ($P < 0.05$). The total area under the glucose concentration curve was

also higher ($P < 0.05$) in the HF-TR compared to HF-Sed rats, while it was lower ($P < 0.05$) in the SD-TR compared to the SD-Sed group.

As expected, plasma glucagon concentrations were significantly ($P < 0.01$) increased in all groups ($\sim 90\ 000$ pg/ml) after the glucagon infusion (Fig. 4B). For the whole 60 min period, the only inter-group difference in the area under the glucagon concentration curve was a slightly but significantly ($P < 0.05$) lower value found in the HF-Sed compared to the HF-TR-group. There was no difference in the area under the glucagon concentration curve among groups for the first 40-min time period. Plasma insulin concentrations were significantly ($P < 0.01$) increased in all groups after the glucagon infusion (Fig. 4C). The total area under the insulin concentration curve indicates a higher ($P < 0.05$) insulin concentration in the SD-Sed compared to all other groups.

As expected, HGP in response to the glucagon infusion was increased ($P < 0.01$) in all groups (Fig. 5A). Due to the variations of the response with time, the area under the glucose production curve was calculated for different time periods. In the pre-infusion period (-10 to 0 min), there was no significant difference ($P < 0.05$) in glucose production among groups (Fig. 5C). During the first 25 and 40 min time periods of the hyperglucagonemic infusion, the area under the glucose production curve was significantly ($P < 0.05$) higher in SD-Sed compared to HF-Sed rats (Fig 5D and E). During this time period, training did not modify the response of HGP in both SD and HF fed groups. For the whole 60 min period, the area under the glucose production curve was also significantly ($P < 0.05$) lower in the HF-Sed compared to SD-Sed animals (Fig. 5B). When the whole 60 min period of infusion is considered, training resulted in significantly ($P < 0.05$) higher glucagon-induced hepatic glucose production in HF fed rats while it resulted in a lower value in the SD fed group ($P < 0.05$). Fig. 6 shows the association between the level of hepatic triglycerides and the HGP (0-60 min) for all rats throughout the experiment. This comparison reveals a strong negative relationship between hepatic glucose production and hepatic triglyceride concentrations ($R = -0.849$; $P < 0.001$).

DISCUSSION

The present study was undertaken to determine if a HF diet-induced hepatic steatosis is associated with a reduction in HGP in response to a hyperglucagonemic infusion in rats and, in the eventuality of such an association, if endurance training reduces this deleterious effect. Data from the present study indicate a ~ 35% reduction in hepatic glucose production during a 60 min hyperglucagonemic infusion following an 8-week HF diet-induced hepatic steatosis. This response was improved by ~50% when rats were submitted to a 6-week concurrent exercise training program. When all groups are taken together, a strong negative correlation was found between liver triglyceride levels and hyperglucagonemia-induced hepatic glucose production. Taken altogether, data of the present study are the first to indicate a state of hepatic glucagon resistance associated with an increase in liver lipid infiltration following a HF diet in rats.

A state of hepatic glucagon resistance was previously reported in different physiopathological conditions. Decreased glucagon binding was observed in hepatocytes of hyperglucagonemic diabetic rats (3). Hepatic resistance to glucagon was also reported in cirrhotic patients independently of any change in plasma insulin concentration and reduced glycogen stores (6, 25). Rao et al. (27), using a similar hyperglucagonemic infusion as the one used in the present study, reported a 31% reduction in HGP of malnourished rats compared to well-fed littermates. On the whole, the above-mentioned studies are compatible with the observation that a state of hepatic glucagon resistance may develop under special circumstances and that the extent of the present hepatic glucagon resistance (~ 35%) is similar to what has been reported in other studies (27).

The mechanism(s) by which high-fat diet and/or hepatic lipids would induce a state of hepatic glucagon resistance remains to be elucidated. Data from the present study suggest that the level of liver triglycerides may be involved in the mechanism of HF diet-induced glucagon resistance in the liver. This suggestion is supported by the strong negative association found between the level of triglycerides and the level of glucagon-stimulated hepatic glucose production (Fig.6). A similar association was recently reported between hepatic triglyceride content and the lack of inhibiting action of insulin on hepatic glucose output in HF fed rats (16). An impairment in the

coupling of glucagon receptors to stimulatory G protein (Gs) system in liver plasma membrane of obese rats has been previously reported (15). More recently, Podolin et al. (25) reported a reduced protein expression of Gs with aging in rat liver. Since liver triglycerides have been reported to increase with age (23), it is possible that the decreased hepatic ratio of Gs/Gi activity is influenced by the liver lipid content. Although the mechanistic link remains to be established, data from the present study provide good evidence of an association between liver lipid infiltration and the development of a state of hepatic glucagon resistance.

Aside from conditions associated with liver lipid infiltration, endurance training has been reported to improve hepatic glucagon sensitivity in humans and in rats (11,19). Bonjorn et al. (5) also showed that a single bout of exercise increases hepatic glucagon sensitivity in rats. In agreement with these reports, HGP (for the whole 60 min) increased by ~20% in the HF-TR compared to HF-Sed rats. These data, therefore, indicate that exercise training may improve glucagon sensitivity in rats submitted to a HF diet. Although it can not be excluded that this effect may be attributed to the direct action of exercise training on glucagon receptors (19), it may also be associated with the reduction in liver lipid infiltration when exercise was added to the HF diet. What is puzzling, however, is the reduction in HGP in response to glucagon in SD-TR compared to SD-Sed animals (Fig.5B). One is tempted to suggest that exercise training, under normal dietary conditions, may increase sub-maximal liver response to glucagon infused in physiological concentrations, as a result of greater affinity (19), but does not affect or decrease the near maximal response stimulated by a supraphysiological concentration. The concept that less glucagon is needed to maintain euglycemia during prolonged sub-maximal exercise in trained individuals due to an increased glucagon sensitivity is not incompatible with the interpretation that the maximal capacity to produce glucose in response to large doses of glucagon may not be increased or may even be reduced with training.

Since rats in the present study were in the fed state, it can be assumed that most of the glucose produced by the liver during the glucagon infusion was the result of an increased glycogenolysis. For the whole 60 min period of glucagon infusion, the HF-Sed group showed a ~35 % lower hepatic glucose production despite a ~25% higher hepatic glycogen breakdown compared to SD-Sed group.

Although no attempt was made to quantify gluconeogenesis and glycogenolysis in the present study, it can be postulated that stimulation of gluconeogenesis in response to glucagon infusion was lower in the HF-Sed compared to SD-Sed group. It is, thus, possible that the induction of glucagon resistance following a HF diet-induced liver lipid infiltration affects both the glycogenolysis and the gluconeogenic pathways. As suggested for the comparison between HF-Sed and SD-Sed, the higher HGP in the HF-TR compared to HF-Sed group despite a ~ 42% lower glycogen breakdown in the former could be attributed to an increase in glucagon-induced gluconeogenic activity with training.

As expected, HF compared to SD fed rats depicted higher levels of lipid deposition in liver and in adipocytes (retroperitoneal). There was, however, no effect of dietary or training manipulations on any of the measured plasma lipid variables (glycerol, free fatty acids, and triglycerides). This indicates that differences in plasma lipid response during the glucagon infusion can not explain the observed reduction in hepatic glucose output in HF fed rats. As previously reported (13, 20, 30), a triglyceride lowering effect was observed while plasma glycerol and, to a lesser extent, FFA levels increased during the glucagon infusion in all groups. The known stimulatory effect of glucagon on lipolysis would explain the increased plasma levels of glycerol and FFA observed in the present study (8). On the other hand, the lowering effect of glucagon on plasma triglyceride levels remains unclear. It has been postulated that at high concentrations, glucagon might interfere with the synthesis of apolipoproteins, thus impairing the hepatic release of triglycerides as very low density lipoproteins (10).

Besides changes in plasma lipids, there are other metabolic modifications induced by the glucagon infusion that may explain the changes in HGP observed in the present study. The condition of hyperglucagonemia is an approach similar to the hyperinsulinemic clamp used to assess insulin sensitivity. In the present study, we used the same hyperglucagonemic infusion that we recently used to show an increased sensitivity of the liver to glucagon following exercise (5). There were no differences in glucagon concentrations between HF-Sed and SD-Sed groups over the 60 min period of infusion, thus eliminating the possibility that the reported decrease in hepatic glucose production in the HF-Sed compared to the SD-Sed animals may be due to lower levels of plasma glucagon. Hepatic glucose production values

measured in the resting state were in the same range as those generally reported in SD fed rats (~5-15 mg/kg/min). Peak values following glucagon infusion in the SD fed rats were also within the same range (~30-35 mg/kg/min) as those reported by Bonjorn et al.(5). It is intriguing, however, to observe the kinetic variations in hepatic glucose production curves over time during the course of the glucagon infusion. The transitory aspect of these variations, especially in the HF-Sed group, makes that they can hardly be attributed to a lack of liver glycogen or to an evanescent effect of glucagon. Although these variations are difficult to explain, it is important to mention that the reduction in hepatic glucose production in HF-Sed compared to SD-Sed animals was observed whether values were measured after 25, 40, or 60 min of glucagon infusion.

It is also possible that the glucagon-induced reactive hyperinsulinemia might have interfered differently among groups with the effects of glucagon. Hyperinsulinemia was similar in all groups with the exception of higher levels in the SD-Sed group (Fig.3C). Since insulin is known to inhibit hepatic glucose output, the higher hyperinsulinemia in the HF-Sed group can not explain the higher level of HGP found in this group. In vivo and in vitro studies have indicated that the effects of insulin in liver may be overridden by high doses of glucagon (4,22), as was the case in the present study. Similarly to insulin, the levels of glucagon-induced hyperglycemia, also known to inhibit HGP, were higher in groups showing the highest hepatic glucose output (SD-Sed and HF-TR vs HF-Sed). It is also unlikely that relatively small differences in hyperglycemia (~ 300 mg/dl), as oppose to basal values, play an important role in inhibiting HGP to a different extent. One explanation for the loss of inhibitory effect of plasma glucose on hepatic glucose production in type 2 diabetes and in cirrhotic patients may be that the high levels of circulating glucagon override the basic control of hepatic glucose production (14, 32). It is our view that hyperinsulinemia and hyperglycemia being the consequence of hyperglucagonemia-induced hepatic glucose output did not interfere significantly with the action of supraphysiological glucagon and consequently did not need to be clamped at supraphysiological values. Finally, one could argue that the interpretation of the present data is limited to the situation of hyperglucagonemia. Although there is a possibility that the observed effects may have been different with a more physiological infusion of glucagon, hyperglucagonemia, similarly to an

hyperinsulinemic-euglycemic clamp, eliminates the possibility that the action of the hormone is limited by its secretion or by its plasma concentration. Altogether, it appears that the present hyperglucagonemic infusion was an appropriate approach to demonstrate that livers from HF fed rats are glucagon resistant.

In summary, results of the present study indicate that a HF diet-induced hepatic steatosis results in a reduction in HGP during a hyperglucagonemic infusion and that endurance training partially reverses the glucagon resistant state. Based on the strong negative association between hepatic triglyceride content and glucagon-stimulated hepatic glucose output, it is suggested that liver lipid infiltration may interfere with the action of glucagon, thus inducing glucagon resistance in liver. Whether the accumulation of cytosolic triglycerides in liver interfere with the action of glucagon through the accumulation of cytosolic long-chain fatty acid-CoA, diacylglycerol, or ceramides, as it has been postulated for hepatic insulin resistance (18), remains to be determined.

ACKNOWLEDGMENTS

Results of this study were published as an abstract form in *The FASEB Journal* 2003; 17(5) : A860 (570.1). K. Couturier is with Equipe Mixte INSERM 221, Laboratoire de Bioénergétique Fondamentale et Appliquée. Université Joseph Fournier, Grenoble, France. We thank S. Sokoloff for assistance in the hepatic glucose production analyses. This work was supported by grants from Natural Sciences and Engineering Research Council of Canada (NSERC) and Fonds pour la Formation des Chercheurs et l'Aide à la Recherche (FCAR; Gouvernement du Québec).

REFERENCES

1. Allsop JR, Wolfe RR, Burke JF. The reliability of rates of glucose appearance in vivo calculated from constant tracer infusion. *Biochem J* 1978; 172 :407-416, 1978.
2. Angulo P. Nonalcoholic fatty liver disease. *N Engl J Med* 346: 1221-1231
3. Bethena SJ, Voyles NR, Smith S, Recant L. Decreased glucagon receptors in diabetic rat hepatocytes. *J Clin Invest* 1978; 61: 1488-1497
4. Bomboy JD, Lewis SB, Sinclair-Smith BC, Lacy WW, Liljenquist JE. Insulin-glucagon interaction in controlling splanchnic glucose production in normal man. *J Clin Endocrinol Metab* 1977; 44 : 474-480
5. Bonjorn VM, Latour MG, Bélanger P, Lavoie JM. Influence of prior exercise and liver glycogen content on the sensitivity of the liver to glucagon. *J Appl Physiol* 2002; 92 : 188-1994
6. Bugianesi E, Kalhan S, Burkett E, Marchesini G, McCullough A. Quantification of gluconeogenesis in cirrhosis: response to glucagon. *Gastroenterology* 1998; 115: 1530-1540
7. Burt AD, Mutton A, Day CP. Diagnosis and interpretation of steatosis and steatohepatitis. *Semin Diagn Pathol* 1998; 15: 246-258
8. Carlson MG, Snead WL, Campbell PJ. Regulation of free fatty acid metabolism by glucagon. *J Clin Endocrinol Metab* 1993; 77: 11-15
9. Daemen MJAP, Vervoot-Peters HTM, Thijssen HHW. Apparent dose dependency of the hepatic (S)-acenocoumarol clearance in the rat: a study using open liver biopsies. *J Pharm Sci* 1986; 75: 238-240
10. De Oya M, Prigge WF, Swenson DE, Grande F. Role of glucagon on fatty liver production in birds. *Am J Physiol* 1971; 22: 25-30
11. Drouin R, Lavoie C, Bourque J, Ducros F, Poisson D, Chiasson JL. Increased hepatic glucose production response to glucagon in trained subjects. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 1998; 274: E23-E28
12. Gauthier M-S, Couturier K, Latour, J-G, Lavoie JM. Concurrent exercise prevents high-fat diet induced macrovesicular hepatic steatosis. 2003; *J Appl. Physiol* 94: 2127-2134
13. Gerich JE, Lorenzi M, Bier DM, Tsalikian E, Schneider V, Karam JH, Forsham PH. Effects of physiological levels of glucagon and growth hormone on human

- carbohydrate and lipid metabolism. Studies involving administration of exogenous hormone during suppression of endogenous hormone secretion with somatostatin. *J Clin Invest* 1976; 57: 875-884
14. Hamberg O, Vilstrup H. Effects of glucose on hepatic conversion of aminonitrogen in patients with cirrhosis: relationship to glucagon. *Hepatology* 1994; 19: 45-54
15. Houslay MD, Gawler DJ, Milligan G, Wilson A. Multiple defects occur in the guanine nucleotide regulatory protein system in liver plasma membranes of obese (fa/fa) but not lean (FA/FA) Zucker rats: loss of functional Gi and abnormal Gs function. *Cell signal* 1989; 1: 9-22
16. Iglesias MA, Ye J-M, Frangioudakis G, Saha AK, Tomas E, Ruderman NB, Cooney GJ, Kraegen EW. AICAR administration causes an apparent enhancement of muscle and liver insulin action in insulin-resistant high-fat-fed rats. *Diabetes* 2002; 51: 2886-2894
17. Kjaer M, Kiens B, Hargreaves M, Richter EA. Influence of active muscle mass on glucose homeostasis during exercise in humans. *J Appl Physiol* 1991; 71: 552-557
18. Lam TKT, Carpentier A, Lewis GF, van de Werve G, George Fantus I, Giacca A. Mechanisms of the free fatty acid-induced increase in hepatic glucose production. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2003; 284: E863-E873
19. Légaré A, Drouin R, Milot M, Massicotte D, Péronnet F, Massicotte G, Lavoie C. Increased density of glucagon receptors in liver from endurance trained rats. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2001; 280: E193-E196
20. Liljenquist JE, Bomboy JD, Lewis SB, Sinclair-Smith BC, Felts PW, Lacy WW, Crofford OB, Liddle GW. Effects of glucagon on lipolysis and ketogenesis in normal and diabetic men. *J Clin Invest* 1974; 53: 190-197
21. Lo S, Russell JC, Taylor AW. Determination of glycogen in small tissue samples. *J Appl Physiol* 1970; 28: 234-236
22. Mackrell DJ, Sokal JE. Antagonism between the effects of insulin and glucagon on the isolated liver. *Diabetes* 1969; 18: 724-732
23. Murawski U, Kriesten K, Egge H. Age related changes of lipid fractions and total fatty acids in liver lipids and heart lipids of female and male rats aged 37-1200 days (liver) and 331-1200 days (heart). *Comp Biochem Physiol B* 1990; 96:271-289

24. Petrides AS, DeFronzo RA. Failure of glucagon to stimulate glycogenolysis in well-nourished patients with mild cirrhosis. *Metabolism* 1994; 43: 85-89
25. Podolin DA, Wills BK, Wood IO, Lopez M, Mazzeo RS, Roth, DA. Attenuation of age-related declines in glucagon-mediated signal transduction in rat liver by exercise training. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2001; 281: E516-E523
26. Radziuk J, Norwich KH, Vranic M. Experimental validation of measurements of glucose turnover in nonsteady-state. *Am J Physiol Endocrinol Metab Gastrointest Physiol* 1978; 234: E84-E92
27. Rao RH. Adaptations in glucose homeostasis during chronic nutritional deprivation in rats: hepatic resistance to both insulin and glucagon. *Metabolism* 1995; 44: 817-824
28. Saltiel AR, Kahn CR. Insulin signalling and the regulation of glucose and lipid metabolism. *Nature* 2001; 414: 799-806
29. Seppala-Lindroos A, Vehkavaara S, Hakkinen AM, Goto T, Westerbacka J, Sovijarvi A, Halavaara J, Yki-Jarvinen H. Fat accumulation in the liver is associated with defects in insulin suppression of glucose production and serum free fatty acids independent of obesity in normal men. *J Clin Endocrinol Metab* 2002; 87: 3023-3028
30. Schneider SH, Fineberg SE, and Blackburn GL. The acute metabolic effects of glucagon and its interaction with insulin in forearm tissue. *Diabetologia* 1981; 20: 616-621
31. Steele R. Influences of glucose loading and of injected insulin on hepatic glucose output. *Ann NY Acad Sci* 1959; 82: 420-430
32. Toft I., Gerich JE, Jenssen T. Autoregulation of endogeneous glucose production during hyperglucagonemia. *Metabolism* 2002; 51: 1128-1134

LEGENDS

Fig. 1. Plasma triglyceride concentrations and total area under the plasma triglyceride concentration curves (A) in response to the glucagon infusion and liver triglyceride concentrations (B) measured at the end of the experiment in rats subjected to different dietary and training manipulations. Values are means \pm SE with $n = 8 - 10$ rats/group. HF-SED: high fat diet-sedentary; HF-TR: high fat diet-trained; SD-SED: standard diet-sedentary; SD-TR: standard diet-trained. & Significantly different from pre-infusion condition in all groups, $P < 0.01$. *Significantly different between indicated groups, $P < 0.05$; ** $P < 0.01$.

Fig. 2. Plasma glycerol and free fatty acid concentrations and total area under glycerol (A) and free fatty acid (B) concentration curves in response to the glucagon infusion in rats subjected to different dietary and training manipulations. Values are means \pm SE with $n = 8 - 10$ rats/group. HF-SED: high fat diet-sedentary; HF-TR: high fat diet-trained; SD-SED: standard diet-sedentary; SD-TR: standard diet-trained. & Significantly different from pre-infusion condition in all groups, $P < 0.01$.

Fig. 3. Liver glycogen concentrations (A) before (full bars) and after (hatched bars) the infusion of glucagon and liver glycogen breakdown (B) in response to the infusion of glucagon in rats subjected to different dietary and training manipulations. Values are means \pm SE with $n = 8 - 10$ rats/group. HF-SED: high fat diet-sedentary; HF-TR: high fat diet-trained; SD-SED: standard diet-sedentary; SD-TR: standard diet-trained.* Significantly different between indicated groups, $P < 0.05$; ** $P < 0.01$.

Fig.4. Plasma glucose (A), glucagon (B) and insulin (C) concentrations and total area under the respective concentration curves in response to the glucagon infusion in rats subjected to different dietary and training manipulations. Values are means \pm SE with $n = 8 - 10$ rats/group. HF-SED: high fat diet-sedentary; HF-TR: high fat diet-trained; SD-SED: standard diet-sedentary; SD-TR: standard diet-trained. &

Significantly different from pre-infusion condition in all groups, $P < 0.01$.

*Significantly different between indicated groups, $P < 0.05$; ** $P < 0.01$.

Fig.5. Glucose production (A) and total area under the glucose production rate curves (minutes 0-60, -10 to 0, 0-25 and 0-40; B, C, D and E, respectively) in response to the glucagon infusion in rats subjected to different dietary and training manipulations. Values are means \pm SE with $n = 8 - 10$ rats/group. HF-SED: high fat diet-sedentary; HF-TR: high fat diet-trained; SD-SED: standard diet-sedentary; SD-TR: standard diet-trained. * Significantly different between indicated groups, $P < 0.05$.

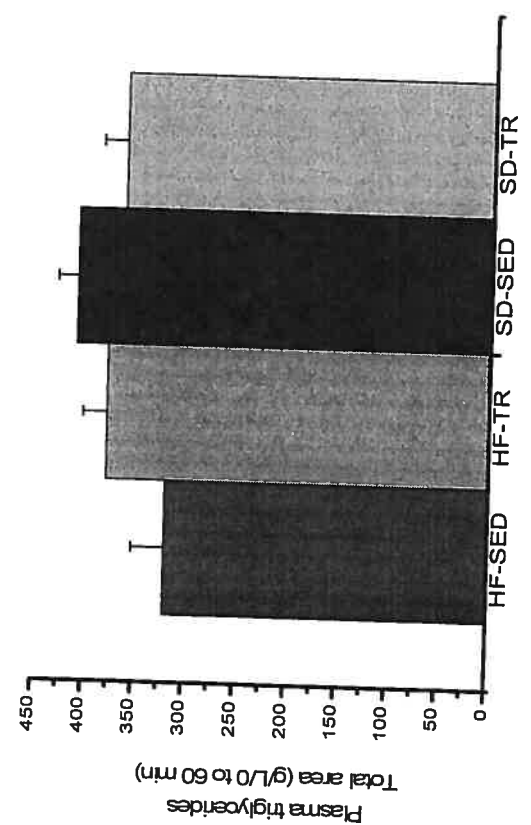
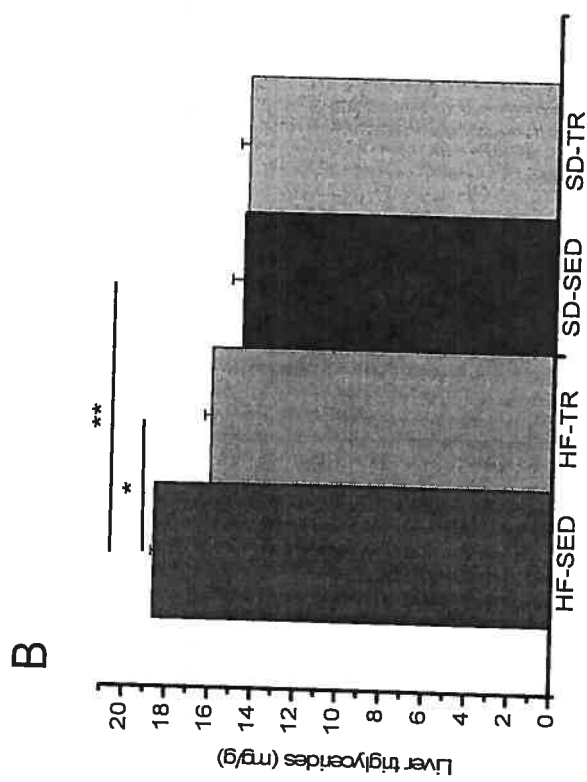
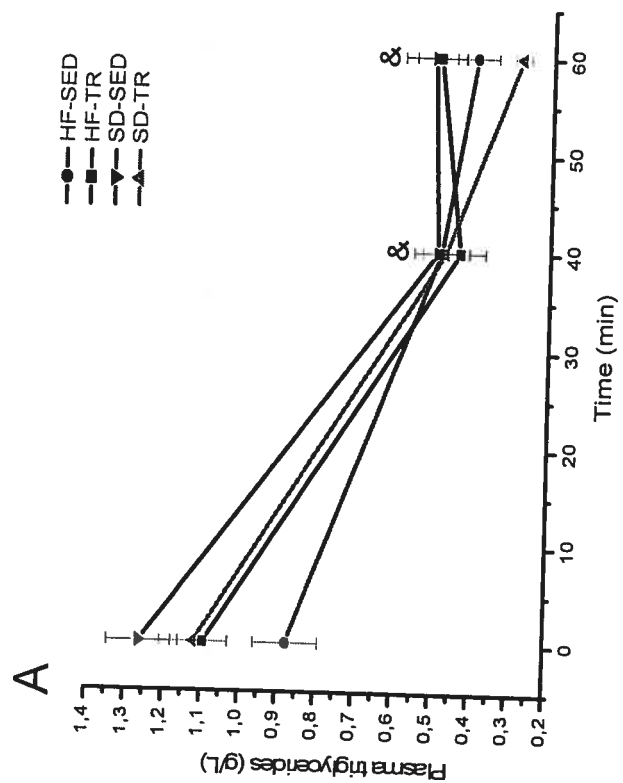
Fig. 6. Relationship between total area under the glucose production curve (R_a ; 0 - 60 min) and liver triglyceride concentrations ($n = 35$, $P < 0.001$) for all rats in all dietary and training conditions.

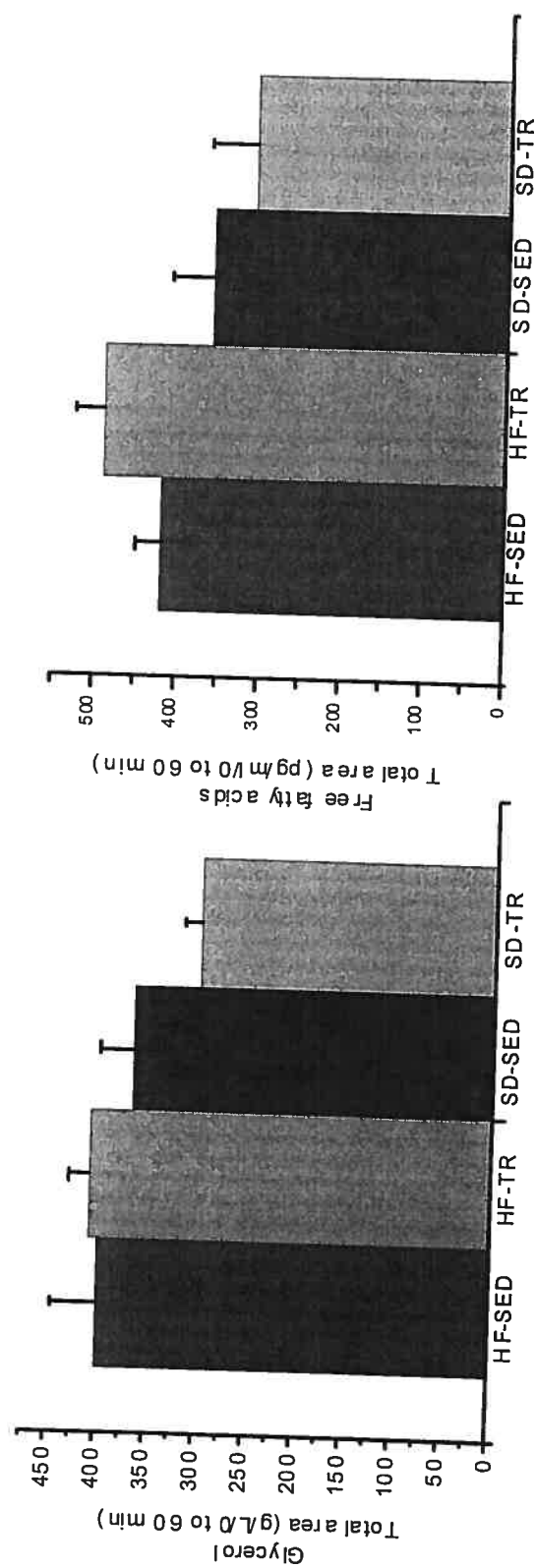
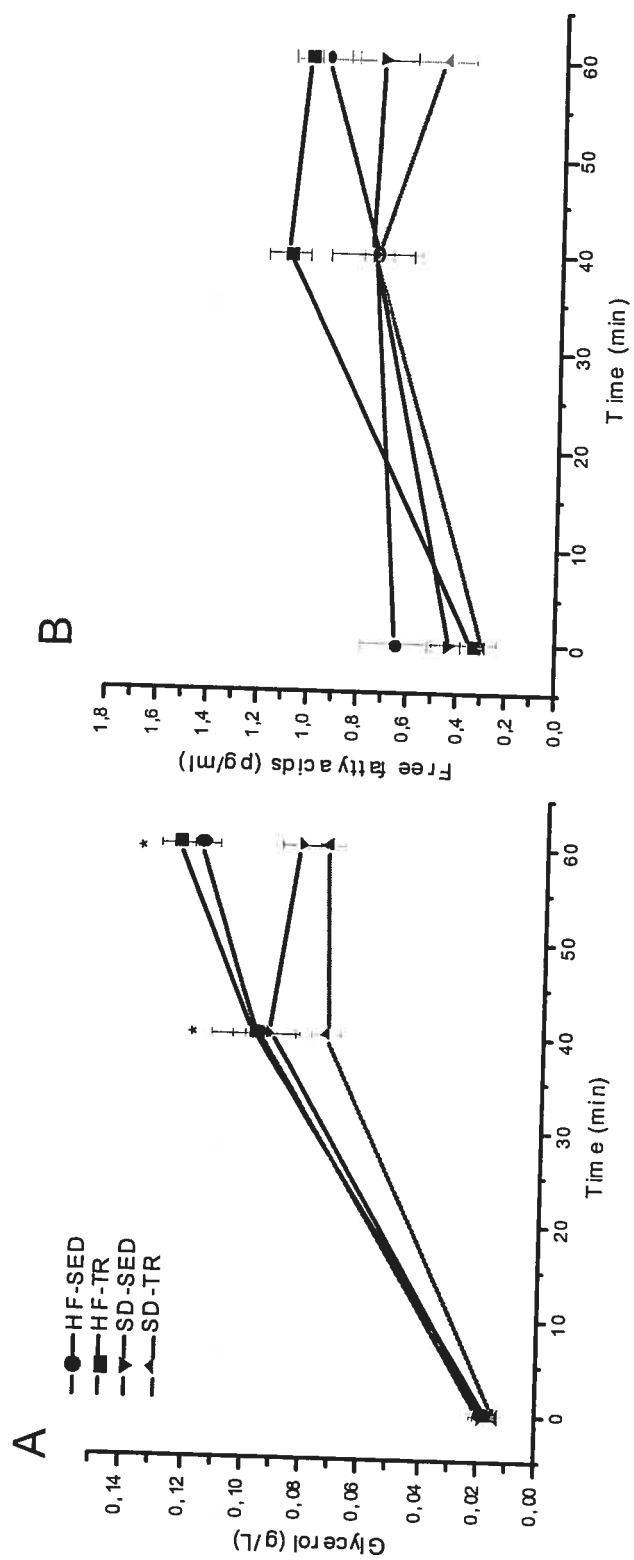
Table 1. Body weight (BW) measured at week 0, 4 and 8 of the experimental period and weight of fat pads measured at the end of the experiment.

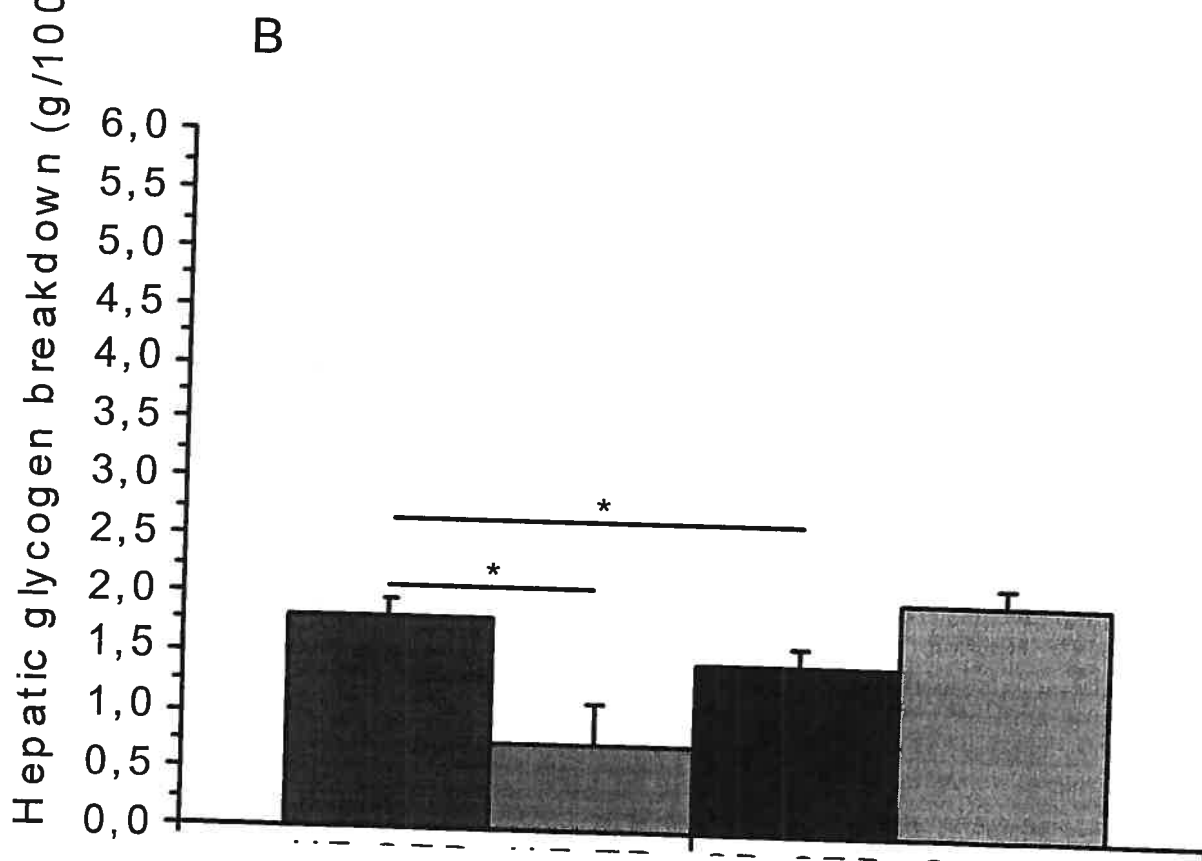
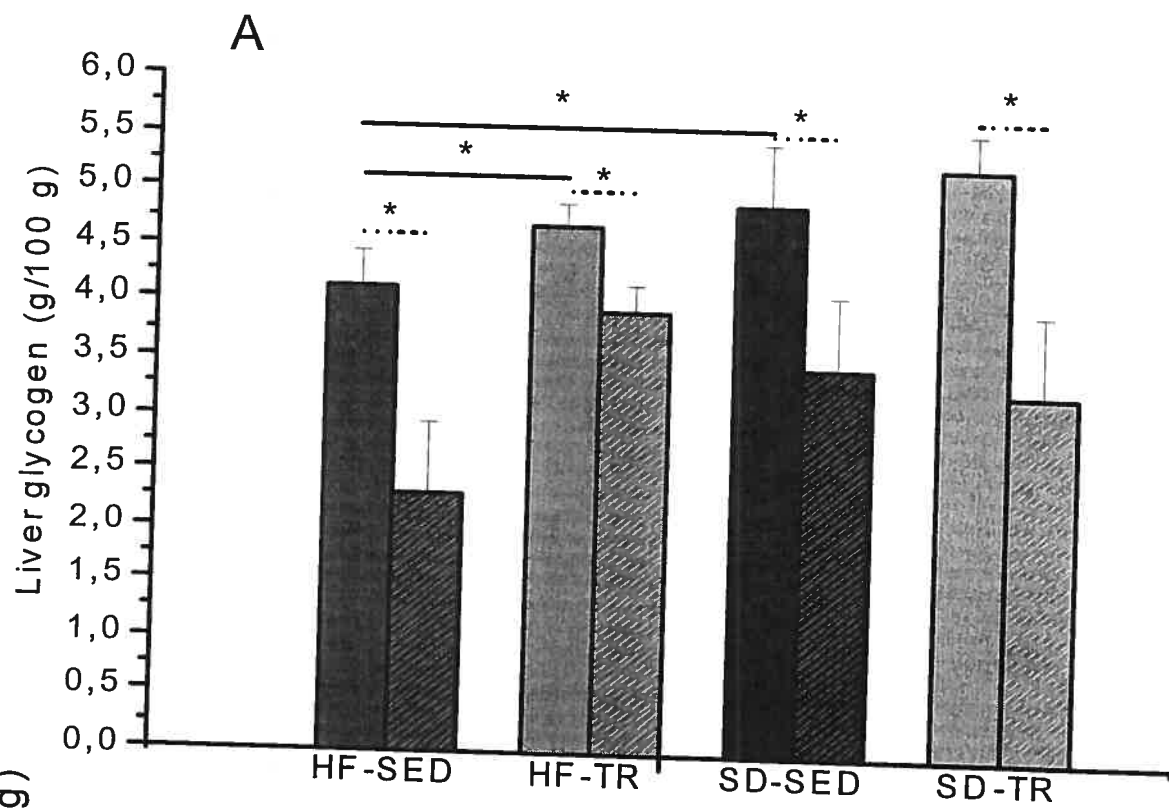
	HF-Sed	HF-TR	SD-Sed	SD-TR
Initial Weight (g)	234 ± 4.4	235 ± 3.9	238 ± 4.2	242 ± 8.2
Weight at Week 4 (g)	280 ± 6.4	274 ± 7.0	282 ± 7.8	271 ± 8.0
Weight at Week 8 (g)	317 ± 15.0	312 ± 11.0	326 ± 11.9	315 ± 8.9
Retroperitoneal Fat Pad (g/100 g BW)	2.3 ± 0.3 ^{a, b}	1.8 ± 0.2	1.7 ± 0.2 ^b	1.4 ± 0.1
Mesenteric Fat Pad (g/100g BW)	2.4 ± 0.4 ^b	2.0 ± 0.2	2.2 ± 0.3 ^b	1.9 ± 0.2

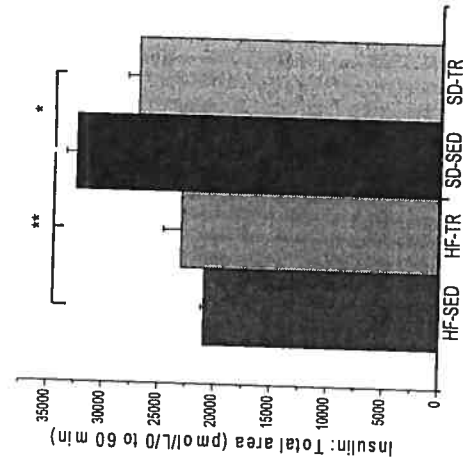
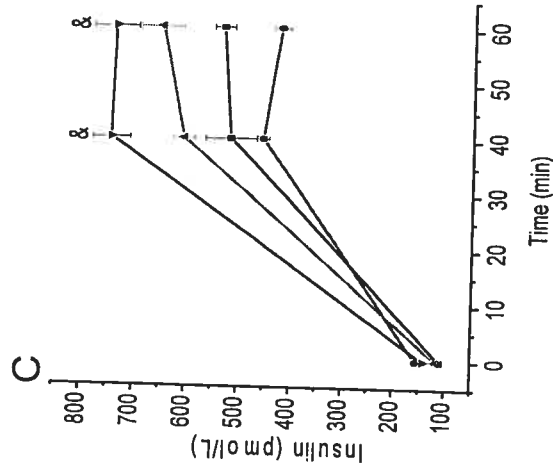
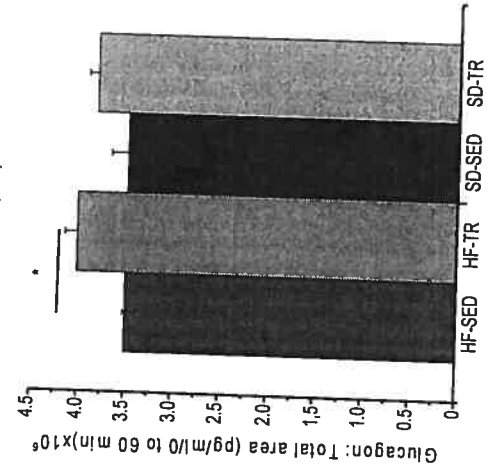
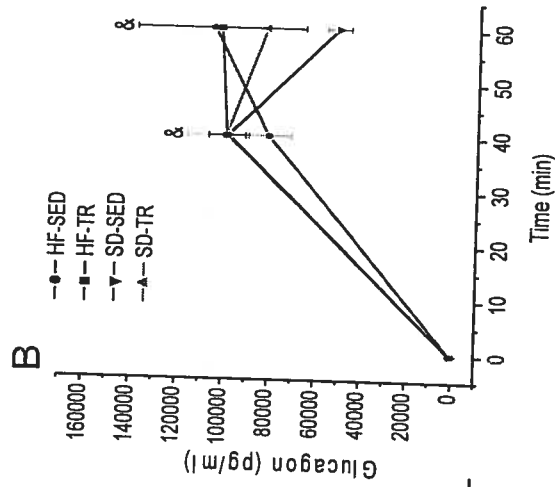
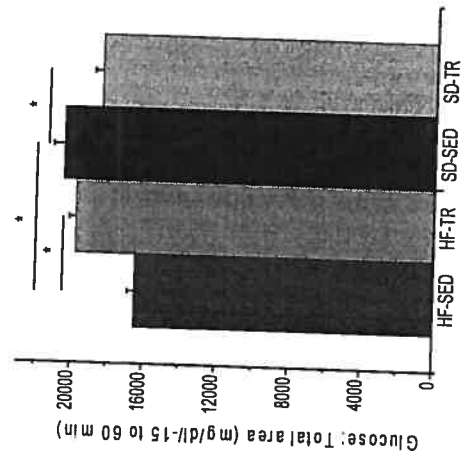
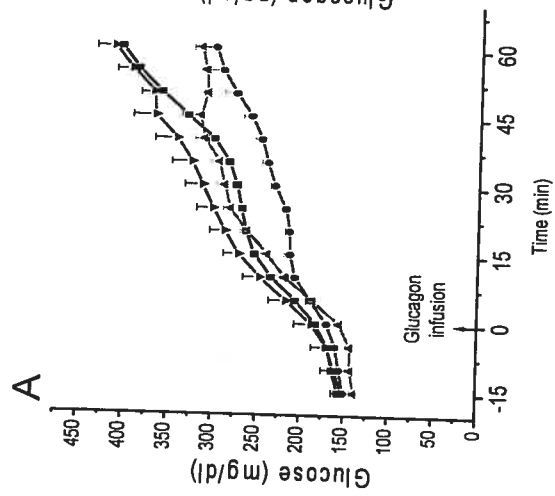
Values are reported as means ± SE (n = 8 – 10 rats/group). HF-Sed: high fat diet-sedentary; HF-TR: high fat diet-trained; SD-Sed: standard diet-sedentary; SD-TR: standard diet-trained. ^aSignificantly different from standard-fed counterpart ($P < 0.05$). ^bSignificantly different from trained counterpart ($P < 0.05$).

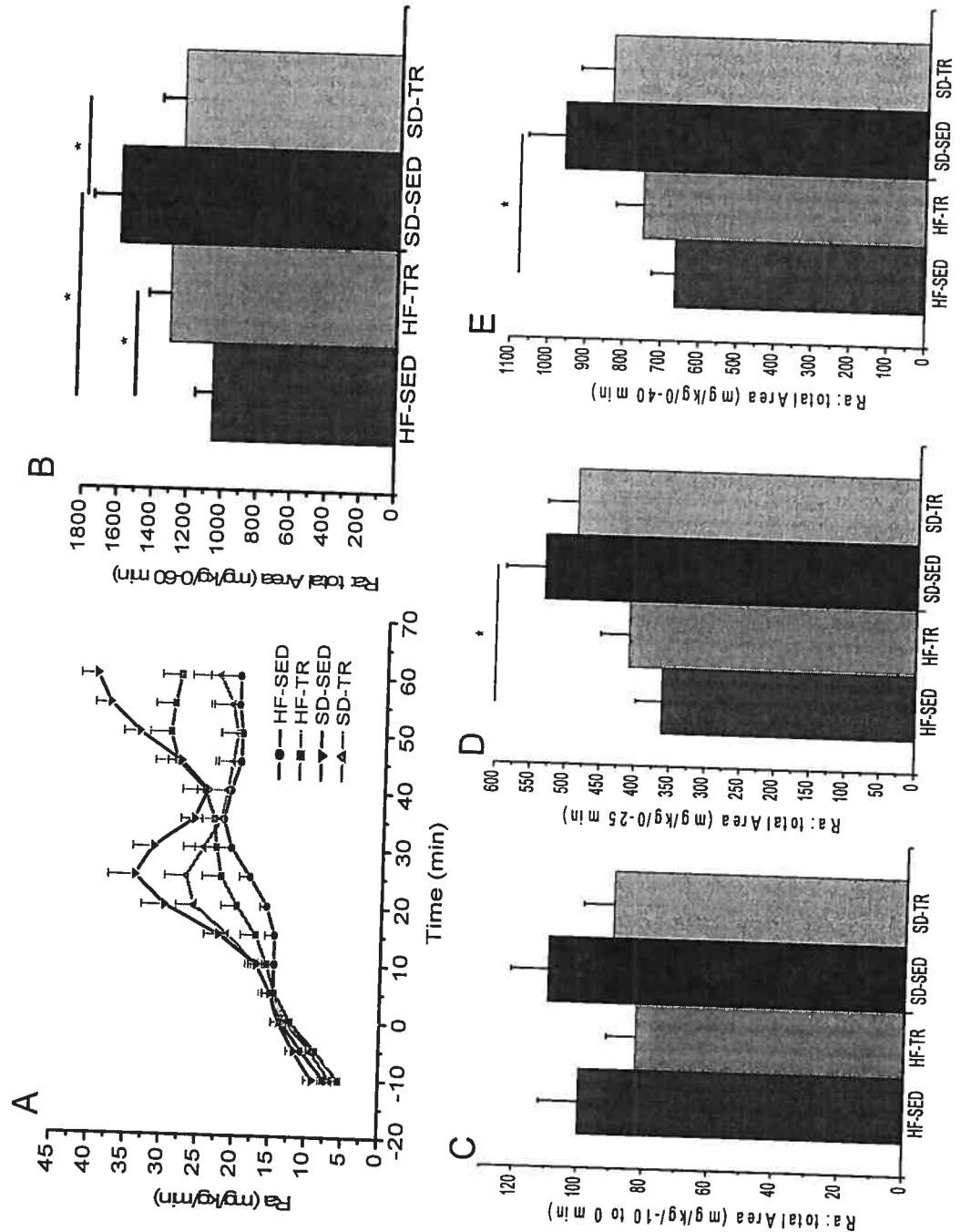
FIGURES
MANUSCRIT 1

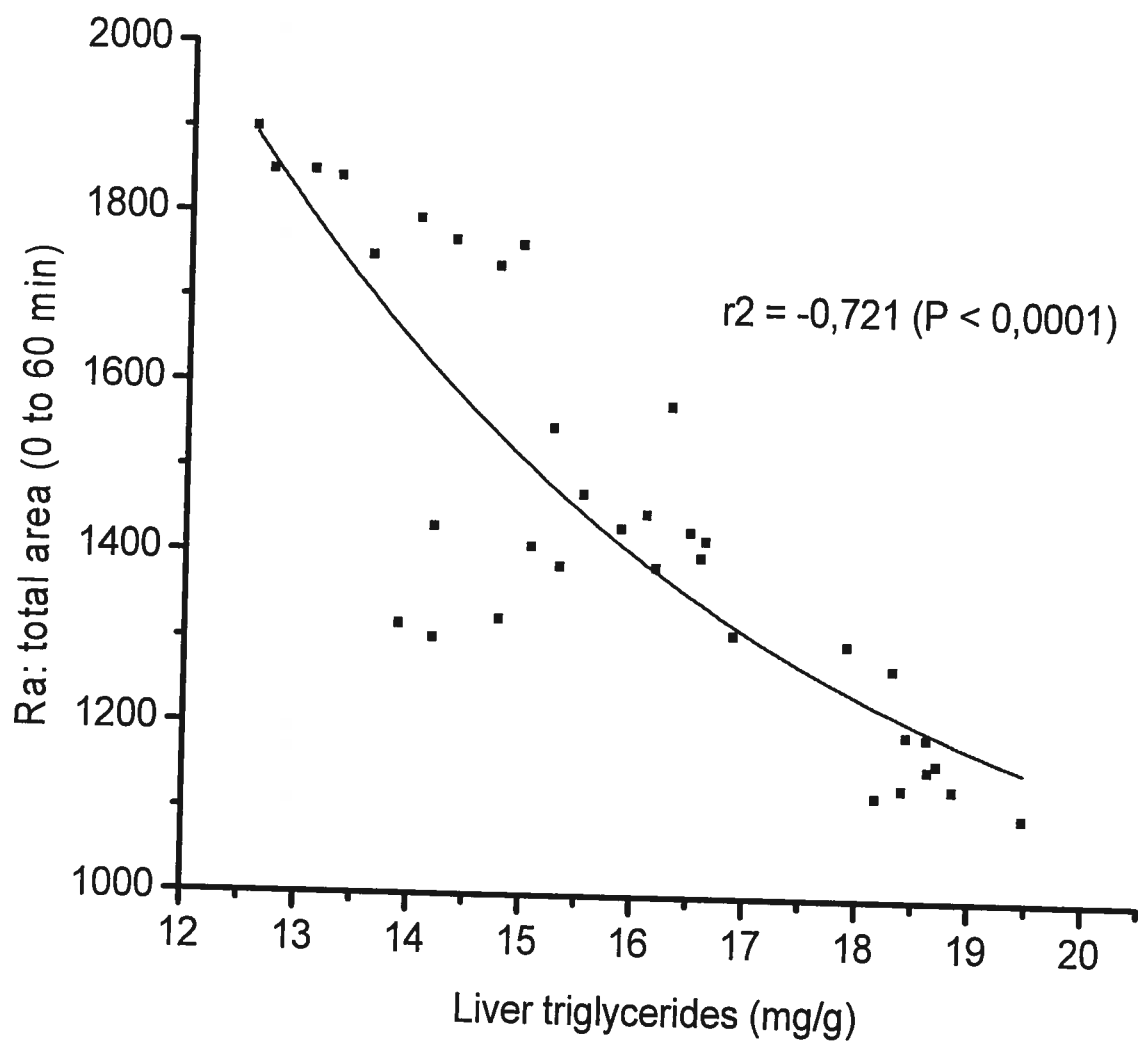












Chapitre 4

Manuscrit 2

Titre

Alterations in Hepatic Glucagon Receptor Density, and in $G_{s\alpha}$ and $G_{i\alpha 2}$ Protein Content with Diet-Induced Hepatic Steatosis: Effects of Acute Exercise

Auteurs

Alexandre Charbonneau, Alexandre Melançon, Carole Lavoie et Jean-Marc Lavoie

Journal

American Journal of Physiology, Endocrinology and Metabolism, Jul; 289(1): E8-14, 2005

SOMMAIRE

La présente étude a pour objectif de vérifier les hypothèses qu'une infiltration de lipides hépatiques induite par une diète riche en lipides 1) diminue la densité (B_{max}) et l'affinité (K_d) des récepteurs au glucagon (RG) tout en 2) diminuant et augmentant le contenu respectif en protéines G stimulantes ($G_{s\alpha}$) et inhibitrices ($G_{i\alpha 2}$) des membranes plasmiques des hépatocytes et 3) qu'un effort physique de 30 minutes suite à deux semaines d'une diète riche en lipides, rétablirait les paramètres relatifs aux RG et aux protéines G à des niveaux similaires que les groupes nourris avec une diète standard. Pour une durée de deux semaines, deux groupes de rates Sprague-Dawley sont nourris avec une diète standard (SD) tandis que deux autres groupes sont nourris avec une diète riche en lipides (HF; 42% kcal). Dans les deux traitements alimentaires, un groupe de rat reste sédentaire pour la durée de l'expérience (Rest) tandis qu'un second groupe est soumis à une seule séance d'exercice en endurance sur tapis roulant d'une durée de trente minutes (26 m/min, 0% d'inclinaison) immédiatement avant le sacrifice (Ac-Ex). En comparaison avec la diète SD, la diète HF entraîne 1) une plus grande concentration de triglycérides hépatiques (123%), d'adiposités et d'acides gras libres circulants ($P < 0.05$). De plus, la diète HF diminue significativement la densité des RG (45%) et le contenu en protéines $G_{s\alpha}$ (75%) tout en augmentant le contenu en protéines $G_{i\alpha 2}$ (27%). Aucun effet sur l'affinité des RG (K_d) est observé pour l'ensemble des groupes expérimentaux. Lorsque les concentrations individuelles de triglycérides hépatiques sont comparées aux valeurs de B_{max} , une relation causale significative est observée entre l'augmentation de lipides hépatiques et la diminution de la densité des RG ($R = -0,512$, $P < 0.003$). Une séance d'exercice en endurance de 30 minutes permet d'augmenter ($P < 0.05$) les concentrations plasmatiques d'acides gras libres et de glucagon en plus de diminuer ($P < 0.05$) celles de l'insuline dans les groupes nourris à une diète standard. À l'exception d'une diminution du contenu protéique en $G_{i\alpha 2}$ dans le groupe HF, aucune modification dans les paramètres reliés aux récepteurs membranaires hépatiques au glucagon et au contenu membranaire hépatique en protéines G est observée suite à un exercice en endurance de 30 minutes. La présente étude montre que l'ingestion d'une diète HF pour une durée de deux semaines

entraîne une diminution dans le nombre de récepteurs membranaires hépatiques au glucagon et dans le contenu en protéines $G_{s\alpha}$. Nous croyons que l'infiltration de lipides au niveau hépatique interfère avec l'action du glucagon sur le foie en diminuant le nombre de RG et les protéines impliquées dans le système de signalisation intracellulaire du glucagon.

Mots-clés: Infiltration hépatique de lipides; densité et affinité du récepteur au glucagon; diète riche en lipides; foie, depots adipeux

SUMMARY

The present study was undertaken to test the hypothesis that a high-fat diet-induced liver lipid infiltration is associated with a reduction of hepatic glucagon receptor density (B_{max}) and affinity (K_d) and with a decrease in stimulatory G-protein ($G_{s\alpha}$) content while enhancing inhibitory G-protein ($G_{i\alpha 2}$) expression. We also hypothesized that, under this dietary condition, a single bout of endurance exercise would restore hepatic glucagon receptor parameters and G protein expression to standard levels. Female Sprague-Dawley rats were either fed a standard (SD) or a high-fat diet (HF; 40% kcal) for two weeks ($n = 20$ rats/group). Each dietary group was, thereafter, subdivided into a non-exercised (Rest) and an acute exercised group (Ac-Ex). The acute exercise consisted of a single bout of endurance exercise on a treadmill (30 min, 26 m/min, 0% slope) immediately before sacrifice. The HF compared to the SD diet was associated with significantly ($P < 0.05$) higher values in hepatic triglyceride concentrations (123%), fat pad weight, and plasma FFA concentrations. The high-fat diet also resulted in significantly ($P < 0.05$) lower hepatic glucagon receptor density (45 %) and $G_{s\alpha}$ protein content (75%) as well as higher ($P < 0.05$) $G_{i\alpha 2}$ protein content (27%) with no significant effects on glucagon receptor affinity. Comparisons of all individual liver triglyceride and B_{max} values revealed that liver triglycerides were highly ($P < 0.003$) predictive of the decreased glucagon receptor density ($R = -0.512$). Although the 30-min exercise bout resulted in some typical exercise effects ($P < 0.05$) such as an increase in FFA (SD diet), a decrease in insulin levels, and an increase in plasma glucagon concentrations (SD diet), it did not change any of the responses related to liver glucagon receptors and G proteins with the exception of a significant ($P < 0.05$) decrease in $G_{i\alpha 2}$ protein content under the HF diet. The present results indicate that the feeding of a high-fat diet is associated with a reduction in plasma membrane hepatic glucagon receptor density and $G_{s\alpha}$ protein content, which are not attenuated by a 30-min exercise bout. It is suggested that liver lipid infiltration plays a role in reducing glucagon action in the liver through a reduction in glucagon receptor density and glucagon-mediated signal transduction.

Keywords: liver lipid infiltration; glucagon receptor affinity; fat deposits; high-fat diet; liver

INTRODUCTION

It is well established that glucagon exerts a strong action on hepatocytes to increase liver glucose production (18). A state of hepatic glucagon resistance has been observed in association with several physiopathologies including liver cirrhosis, diabetes, and malnutrition (19, 20, 30, 35). Several factors have been identified to explain a decrease in hepatic glucagon sensitivity under these circumstances. Glucagon homologous desensitization, which is defined as a loss of sensitivity of the glucagon receptor by glucagon itself, is one of the plausible explanations. Indeed, under glucagon stimulation, a reduction of liver glucagon receptor density in diabetic rats has been shown in past studies (3, 9). There is also *in vivo* and *in vitro* evidence of an alteration in the expression of liver glucagon receptor mRNA by glucose, cAMP, and oxygen (1, 5, 21, 34, 38). Notwithstanding these mechanisms, it is interesting to note that several of the physiopathological conditions associated with a state of hepatic glucagon resistance are also associated with an increase in liver lipid infiltration. In a recent study (7), we observed a reduction in hepatic glucose production in response to glucagon infusion in high-fat diet-induced hepato-steatotic rats. It was suggested that an increase in liver triacylglycerols could interfere with normal hepatic glucagon action. Thus, the first purpose of the present study was to extend these observations by testing the hypothesis that a high-fat diet-induced hepatic steatosis is associated with changes in glucagon receptor density and affinity.

There is reported evidence of disproportionately larger decrease in c response compared to the decrease in hepatic glucagon binding with diabetic hyperglucagonemia (3). This suggests problems may exist in the transfer of membrane receptor signals to the enzyme (33). Obesity and diabetes have been shown to decrease the two main G proteins of the liver membrane (stimulatory ($G_{s\alpha}$) and inhibitory ($G_{i\alpha 2}$); 2, 6). In addition, Podolin et al. (32) reported that the age-related decline in glucagon signaling capacity and responsiveness may be attributed, in part, to a reduction in the G_s/G_i ratio. These situations may again be associated with an increase in liver lipid infiltration. Whether an increased liver lipid

infiltration may be associated with an alteration in the G protein content in the liver is unknown. Therefore, the second aim of this study was to test the hypothesis that, in addition to a reduction in glucagon receptor density, liver lipid infiltration is also associated with a reduction in hepatic G protein content.

Conversely to several pathophysiological situations (3, 9, 19, 20, 30, 35), chronic and acute physical exercise have been associated with an increased glucagon action in liver. Drouin et al. (10, 11) reported that under glucagon stimulation, trained individuals and animals depicted higher hepatic glucose production than sedentary counterparts. Similarly, Légaré et al. (25) and Podolin et al. (32) demonstrated that endurance training increases hepatic glucagon receptor density and the G_s/G_i ratio in rat. There is also evidence that not only chronic but also acute exercise (60 min) may enhance hepatic glucose production in response to glucagon (28). Whether hepatic glucagon receptor density and G protein content are also increased by an acute bout of exercise is unknown. Therefore, the present study was also designed to test the hypothesis that an acute bout of exercise restores hepatic glucagon receptor density and G protein content under condition of high-fat diet-induced hepatic lipid infiltration.

MATERIALS AND METHODS

Animal care and exercise protocol. Female Sprague-Dawley rats (Charles River, St. Constant, Canada), weighing 180-200 g, were housed individually and allowed food (standard diet or high-fat diet) and water *ad libitum* for 2 weeks after they were received in our laboratory. The lighting schedule was such that lights were on from 0700 until 1900, and room temperature was maintained at 20-23°C. Seven days after their arrival, rats assigned to acutely exercised groups underwent a habituation running protocol on a motor-driven rodent treadmill (Quinton Instruments, Seattle, WA) consisting of three sessions over a 7-day period beginning with 15 min/day at 20 m/min and progressively increased to 30 min/day at 26 m/min (0% grade), so that they were well accustomed to running and being handled. The last habituation session was held 2 days before the experiment for all rats. All exercised animals were restrained from exercise 48h before the experimentation.

Groups and surgery. After their arrival, rats were randomly assigned to one of the four experimental groups. One group of rats was fed with standard (SD) pellet rat chow (12.5% lipids, 62.3% carbohydrate, and 24.3 % protein; kcal; Agribrands Purina Canada, Woodstock, Ontario). A second group was fed with high-fat (HF) small pellets rat chow (42% lipids: 80% lard, 20% corn oil; 36% carbohydrate, and 22% protein (kcal); ICN Pharmaceuticals, NY, USA). The duration of the diet (2 wk) was based on previous time course studies (13) in which we observed that hepatic triglyceride content was highest two weeks after the undertaking of a high-fat diet. Details of the diets are described elsewhere (14). One-half of the animals in each dietary condition were exercised (Ac-Ex) prior to the experimentation (30 min at 26 m/min, 0% grade), whereas the other half remained inactive (Rest). Hence the four experimental groups consisted of SD-fed rats with no exercise (SD/Rest) or acute exercise (SD/Ac-Ex), and HF-fed rats with no exercise (HF/Rest) or acute exercise (HF/Ac-Ex), with $n = 10$ rats/group. On the morning of the experiment, any remaining food was removed from the cages 2-3h before sacrifice. Rats were weighed and anesthetized with pentobarbital (40 mg/kg ip). After complete anaesthesia the abdominal cavity was rapidly opened following the median line of the abdomen. Blood was rapidly (< 45 s) drawn from the abdominal vena cava (~ 4

ml) into a syringe pre-treated with EDTA (15%). The fraction of blood (250 μ l) to be used for glucagon determination was preserved in aprotinin (25 μ l) before centrifugation. The remaining fraction of blood was also centrifuged (Eppendorf centrifuge, no. 5415), and the plasma was stored for subsequent plasma glucose, insulin, triglyceride, and free fatty acid determinations. The liver as well as the mesenteric, urogenital, and retroperitoneal fat deposits were excised and weighed in that order. The liver median lobe was freeze-clamped and used for glycogen and triacylglycerol determinations, while 4 g of fresh liver was taken for membrane isolation. Mesenteric fat pad consisted of adipose tissue surrounding the gastrointestinal tract from the gastro-oesophageal sphincter to the end of the rectum with special care taken in distinguishing and removing pancreatic cells. Urogenital fat pad included adipose tissue surrounding the kidneys, ureters, and bladder as well as ovaries, oviducts and uterus. Retroperitoneal fat pad was taken as that distinct deposit behind each kidney along the lumbar muscles. All plasma and tissue samples were stored at -78°C until analyses.

Materials and isolation of plasma membranes. Sucrose (ultra-pure) was obtained from Schwarz/Mann Div. Becton, Dickson and Co (Orangeburg, NY); p-nitrophenyl thymidine mono-phosphate, cytochrome c, glucose-6-phosphate (Na salt), alkaline phosphatase substrate, p-nitrophenyl- β -N-acetyl glucosaminide, agarose, and Tris base from Sigma Chemical Co. (St.-Louis, MO); protein reagent from Bio-Rad Laboratories (Richmond, CA); 5'-adenosine monophosphate (5'AMP), NADPH, NADH, and ferritin (A grade) from Calbiochem-Behring Corp. (American Hoescht Corp., San Diego, CA); N.N-dimethyl-1, 3-propane diamine from Eastman Organic Chemicals Div., Eastman Kodak CO (Rochester, NY); glutaraldehyde and osmium tetroxide (OsO_4) from Electron Microscopy Sciences (Fort Washington, PA); and 1-ethyl-3 (3-dimethyl aminopropyl) carbodiimide hydrochloride (EDC) from Ott Chemical CO (Muskegan, MI). All other chemicals were reagent grade. All sucrose solutions were prepared 24-48 h before use and their densities determined at room temperature with an Abbé refractometer. The sucrose solutions were filtered (0.22 μ m for 0.25 M and 1.2 μ m for 1.42 and 2.0 M solutions), the pH and density determined, and stored at 4°C .

Liver samples (1.8 -2 g) were weighed, added to 10 volumes of 0.25 M sucrose in a 15 ml glass disposable culture tube (0.25 M sucrose/5 mM Tris HCl, pH 7.2 – 7.6/0.5 and 1.0 mM MgCl_2) and homogenized with a Polytron (Polyscience, model X-520) at 1000-1100 rpm. The solution was centrifuged (25–30 ml per 50 ml plastic tube) at 280 g or 1,800 rpm for 5 min (Beckman GPR centrifuge). The supernatant was saved and the pellet was resuspended in 0.25 M STM to one-half the initial homogenate volume. The suspension was again centrifuged as above. The first and second supernatants were combined and centrifuged at 1,500 g or 2,600 rpm for 10 min. The resulting pellets were pooled and resuspended in 1–2 ml of 0.25 M sucrose per g of liver (initial wet weight). Sucrose (2 mM) was added to obtain a density of 1.18 g/cm^3 (1.42 M, $n = 1,401$) and sufficient sucrose was added to bring the volume to approximately twice that of the original homogenate (i.e. 10% w/vol). Aliquots (35 ml) of the sample were added to cellulose nitrate tubes and overlaid with 2-4 ml of 0.25 M sucrose. After centrifugation for 60 min at 82,000 g (25,000 rpm) in a Beckman ultracentrifuge (model L5-50), the pellicle at the interface was collected with a blunt-tipped Pasteur pipette and resuspended in 0.25 M sucrose to obtain a density of 1.05 g/cm^3 . This suspension was centrifuged at 1500 g for 10 min and the final pellet was resuspended in hepes 50 mM and stored at -78°C for further analysis.

Binding assay. The receptor binding assay used is based on the technique described by Frandsen et al (12) as modified by Légaré et al (25). Purified membranes (10 ug proteins/150 ul), in triplicate, were incubated with ^{125}I -labeled glucagon (NEN Life Science Products, Boston, MA) at concentrations ranging from 0.15 to 3.00 nM in hepes buffer (50 mM, pH 7.6) containing 1% human serum albumin (HAS; Sigma-Aldrich). Incubations were carried out at 30°C for 30 min in a total volume of 150 ul. Aliquots of 100 ul were added to microfuge tubes containing 200 ul of cold (4°C) 2.5% HAS in hepes buffer (50 mM, pH 7.6). Free and membrane bound ^{125}I -glucagon were separated by centrifugation at 10,000 g for 5 min, and the supernatant was discarded. The membrane pellet was washed once with 200 ul of cold hepes buffer containing 2.5% HAS, and the membrane-bound radioactivity was determined with the use of a gamma counter (Wallac 1470 Wizard, Wellesley, MA). The non-specific binding was measured in presence of 3×10^{-6} M glucagon (Sigma-

Aldrich). Based on preliminary experiments, an incubation time of 30 min with membrane protein concentration of 10 ug/150 ul was selected to ensure saturation kinetic sensitivity. The maximal density (Bmax) and the apparent affinity (Kd) of glucagon receptors were obtained through rectangular hyperbolic regression of the specific binding curve (GraphPad Software, San Diego, CA).

Preparation for SDS-PAGE immunoblotting. Liver homogenates were vortexed frequently for 1 h at 4°C then centrifuged at 4500 g for 1h at 4°C. The protein concentration of the supernatant was measured using a Bradford protein assay (Bio-Rad). Liver lysates containing 100 µg of proteins were prepared for SDS-PAGE by dilutions with reducing sample buffer (laemli) followed by a 2-min immersion in near-boiling water.

Quantification of $G_{s\alpha}$ and $G_{i\alpha 2}$ by immunoblotting. Assessment of the stimulatory and inhibitory α -subunits of the hepatic G-proteins ($G_{s\alpha}$ and $G_{i\alpha 2}$) was conducted using standard SDS-PAGE and immunoblotting techniques, as previously described (17). Briefly, all samples were electrophoresed, transferred to nitrocellulose membranes, incubated with purified polyclonal rabbit anti-sera primary antibodies (Calbiochem, La Jolla, CA), and then identified using rabbit anti-goat IgG conjugated to horseradish peroxidase (no. 305-065-003; Jackson laboratory). To quantify hepatic $G_{s\alpha}$ and to ensure equal lane loading, purified fusion proteins were constructed as previously described (32) and both protein standards and sample bands at 48 and 45 kDa were quantified (two distinct isoforms confirmed by Calbiochem). Similar procedures were performed on the 39 kDa band for assessment of $G_{i\alpha 2}$. All gels were poured so that samples from each of the experimental groups were always electrophoresed on the same gels to ensure standardized Western blotting analysis. G proteins were visualized with chemiluminescent solutions A and B (Amersham, Alameda, CA). Image capture analysis was performed on the fusion proteins to quantify G protein content of all membrane samples.

Analytical Methods. Plasma glucose concentrations were determined by using a glucose analyser (Yellow Springs Instruments 2300, Yellow Springs, OH). Insulin

and glucagon concentrations were determined by commercially available radioimmunoassay kits (Radioassay System Laboratory, ICN Biomedicals, Costa Mesa, CA; distributed by Immunocorp, Montréal, Québec, Canada). Plasma and liver triglycerides concentrations were determined by quantitative enzymatic method (Sigma Diagnostics, St. Louis, MO). FFA concentrations were determined by enzymatic colorimetric assay (Roche Diagnostics, Laval, Québec, Canada). Liver glycogen concentrations were determined by using the phenolsulfuric acid reaction (27).

Statistical analysis. All data are reported as means \pm SE. Statistical comparisons were performed by using a two-way ANOVA for non-repeated measures design. Newman Keuls post hoc test was used in the event of a significant ($P < 0.05$) F ratio. Relationship between liver triglyceride concentration and glucagon receptor density (Bmax) was evaluated by linear regression analysis.

RESULTS

There was no difference in body weight between groups at any measured points in time during the 2-wk experimental period (Table 1). Nevertheless, the feeding of the high-fat diet resulted in a significantly higher relative weight of mesenteric, retroperitoneal and urogenital fat deposits ($P < 0.05$). Acute exercise was associated with a significantly ($P < 0.05$) lower weight of all fat pads in the high-fat fed group (Table 1). No differences were observed in relative liver weight between the high-fat and standard fed groups. Nonetheless, acute exercise resulted in a significantly ($P < 0.05$) lower liver weight in both standard and high-fat dietary conditions (Table 1).

No differences in plasma glucose concentration were observed between all groups (Fig. 1). Plasma insulin concentration did not change following the dietary manipulations either in the sedentary or in the acute exercise state (Fig. 1). Nevertheless, exercise resulted in a significantly ($P < 0.05$) lower plasma insulin concentrations in both SD and HF fed groups. Dietary manipulations did not significantly ($P > 0.05$) alter plasma glucagon concentration (Fig. 1). However, exercise resulted in a significant ($P < 0.05$) increase in plasma glucagon concentration in the SD fed group.

As expected, hepatic triglyceride concentrations were significantly ($P < 0.01$) higher with the feeding of the high-fat diet (Fig. 2). Liver triglyceride levels were not affected by the acute exercise in both dietary protocols. Despite a lack of statistical significance, hepatic glycogen concentrations were slightly lower in the high-fat compared to the standard fed rats in both sedentary and exercised groups (Fig. 2). There was also a tendency to lower glycogen levels after the acute exercise in both dietary conditions. Similarly to hepatic triglycerides, plasma free fatty acid concentrations were significantly ($P < 0.05$) higher in the HF compared to SD fed group in the resting state (Fig. 2; $P < 0.05$). Exercise resulted in a significant ($P < 0.05$) increase in plasma free fatty acid concentrations in the SD fed group only. The high-fat diet did not affect plasma triglyceride concentrations in the resting state. However, a single bout of endurance exercise resulted in significantly higher plasma triglyceride concentrations in the HF fed rats (Fig. 2; $P < 0.05$). This resulted in

higher ($P < 0.05$) plasma triglyceride concentrations in the HF/Ac-Ex group compared to its standard-fed counterpart.

In agreement with our hypotheses, glucagon receptor density (Bmax) was significantly ($P < 0.01$) reduced with the feeding of a high fat diet (Fig. 3). An ~45% decrease in Bmax was observed in both HF fed groups. Acute exercise, however, did not have any significant ($P > 0.05$) effect on glucagon receptor density. No differences in glucagon receptor affinity (Kd) were observed between any of the groups (Fig. 3). Hepatic $G_{s\alpha}$ content in rats fed the high-fat diet was ~75% ($P < 0.05$) lower than in rats fed the SD diet in both rest and Ac-Ex conditions (Fig. 4). The acute exercise bout had no effect on liver $G_{s\alpha}$ content. There was an ~27% ($P < 0.05$) increase in $G_{i\alpha 2}$ content with the feeding of the high-fat diet in the resting state. The acute exercise bout significantly ($P < 0.05$) reduced $G_{i\alpha 2}$ content under the high-fat diet (Fig. 4). Even though $G_{i\alpha 2}$ content was increased in the HF/Rest group, the $G_{s\alpha} / G_{i\alpha 2}$ ratio was ~80% lower in the HF compared to SD fed groups (Fig. 4). Acute exercise had no effect on the $G_{s\alpha} / G_{i\alpha 2}$ ratio.

Fig. 5 shows the association between the level of hepatic triglycerides and the Bmax for all rats throughout the experiment. This comparison reveals a negative relationship between glucagon receptor density and hepatic triglyceride concentrations ($R = -0.512$; $P < 0.003$).

DISCUSSION

The present HF diet regimen in rats resulted in a 123% higher fat accumulation in liver compared to the SD fed animals (Fig. 2). Strackowski et al. (37) reported a 190% increase in liver triacylglycerol content with the feeding of a 59% high-fat diet over a period of 3 weeks. In a recent study from our laboratory (14), we found a 72% increase in liver lipid infiltration after eight weeks of the same dietary treatment as the one used in the present study. However, in a subsequent study (13), we reported that the highest accumulation of lipids in liver over a 16-wk period of high-fat feeding occurred during the first 2 weeks (200% increase). The duration of the high-fat feeding in the present study was based on this observation and the results show that it was adequate to cause a substantial accretion of fat inside the liver that is compatible with the development of a state of hepatic steatosis (14).

In addition to liver lipid infiltration, the present HF diet resulted in a 3 fold increase in plasma free fatty acids concentration. Hepatic steatosis is often accompanied with an increase in plasma FFA levels (reviewed in ref. 26). In previous studies in which hepatic steatosis was induced by high-fat diets, a substantial increase in plasma FFA was always observed (13, 14, 37). It has been suggested that the increased delivery of fatty acids to the liver could result in a higher uptake by the liver, since FFA uptake is mostly done in a concentration-dependant manner. Taking together, the increased plasma FFA levels following the present high-fat diet are consistent with a metabolic situation leading the development of a state of hepatic steatosis.

The major finding of the present investigation is that a high-fat diet-induced liver lipid infiltration is associated with a 45% reduction in glucagon receptor number (B_{max}), accompanied by a 75% lower plasma membrane level of $G_{s\alpha}$ protein content, and a lower $G_{s\alpha}/G_{i\alpha 2}$ ratio. In a previous study (7), we suggested that liver lipid infiltration was associated with a reduction in glucagon action on hepatic glucose production. The present data extend this observation by being the first to indicate a reduction in glucagon receptor density and $G_{s\alpha}/G_{i\alpha 2}$ ratio in an *in vivo* high-fat model of hepatic steatosis in rats.

There are several factors that may cause a reduction of glucagon receptor density in the liver. In past studies a decreased number of glucagon receptors has been associated with changes in glucagon (3, 9), glucose, and insulin concentrations (1, 5, 34, 38). Since none of these factors were significantly altered by the present high-fat diet, these regulators can hardly explain the present high-fat diet-induced reduction in glucagon receptor density. Data from the present study do suggest, however, that factors related to the HF-diet-induced hepatic steatosis are involved in the reduction in glucagon receptor number. It is not clear, however, if the present HF-diet-induced reduction in glucagon receptor density and in Gs_{α} protein content is due to systemic factors (i.e. circulating lipids) or to elevated intrahepatic triglycerides. In a recent study conducted on isolated livers from HF fed rats, it was concluded that hepatic insulin resistance observed *in vivo* may at least partially result from circulating factors (4). Plasma FFA levels were largely increased by the present HF diet and may, at least partly, explain the reduction in glucagon receptor density. On the other hand, Samuel et al. (36) recently used a 3 day high-fat diet model to increase liver triglyceride content (3 folds), without the confounding effects of peripheral fat accumulation. They provided evidence to support the causal relationship between hepatic fat accumulation and hepatic insulin resistance. That, intrahepatic factors (liver triglycerides) regulate glucagon receptor density is supported by the negative association found between the level of hepatic triglycerides and the measurement of glucagon receptor density. A similar negative association was observed in our previous study between glucagon stimulated hepatic glucose production and hepatic triglyceride concentrations (7). On the other hand, glucagon receptor sensitivity was not affected by the present high-fat diet. This is in line with the findings of Légaré et al. (25) who reported an increase in glucagon receptor density but no difference in the affinity of the glucagon receptors in trained vs untrained rats. Taken together, the present data indicate that a high-fat diet-induced lipid infiltration in the liver results in a reduction in hepatic plasma membrane glucagon receptor density and suggest that this may explain the development of a state of hepatic glucagon resistance under these circumstances.

The precise mechanism(s) by which high-fat diet and/or hepatic lipids would reduce hepatic glucagon receptor density remains to be elucidated. Fat-induced

hepatic insulin resistance has been attributed to impaired insulin-stimulated IRS-1 and IRS-2 tyrosine phosphorylation associated with activation of some isoforms of PKC (22, 36). The activation of PKC by hepatic lipids, in the form of phospholipids, leads to phosphorylation of G-coupled receptor kinases (8, 31). Activation of G-protein receptor kinase proteins is known to desensitize G protein-coupled receptors (23, 24). Whether the accumulation of cytosolic triglycerides could lead to higher phospholipid content in the liver and desensitize the glucagon receptors through activation of such proteins remains to be determined.

The 75% reduction in $G_s\alpha$ content following the high-fat diet observed in the present investigation is consistent with results found in genetically obese animals. Liver cell membranes from ob/ob and db/db mice contains significantly (45%) less alpha-subunit of stimulatory G protein than those from their lean littermates (2, 15). However, the present high-fat diet-induced increase in $G_{i\alpha 2}$ content (27%) has not been found in other studies. Begin-Heick et al. (2) and Gettys et al. (15) observed a significant decrease in $G_{i\alpha 2}$ protein content in db/db and ob/ob plasma liver membrane. It is possible that the $G_{i\alpha 2}$ protein content observed in these studies are specific to mutated animals (ob/ob and db/db) rather than to a short term HF diet-induced hepatic lipid infiltration in normal animals. Nevertheless, the $G_s\alpha/G_{i\alpha 2}$ ratio was largely decreased by the present high-fat diet. Podolin et al. (32) reported a reduced protein expression of $G_s\alpha$ and $G_s\alpha/G_{i\alpha 2}$ ratio (20%) with aging in rat liver. Since liver triglycerides have been reported to increase with age (29), it is possible that the decreased hepatic ratio of $G_s\alpha/G_{i\alpha 2}$ activity observed in these studies were influenced by the liver lipid content. On the whole, the present decrease in protein expression of $G_s\alpha$ and $G_s\alpha/G_{i\alpha 2}$ ratio indicate that the high-fat diet-induced hepatic steatosis reduced not only glucagon receptor density but also glucagon-mediated signal transduction.

Rats were submitted to an acute period of exercise in the present study to test the possibility that such an acute activity may alter the number of plasma membrane glucagon receptors and G protein content. In previous studies, exercise training was

shown to increase hepatic glucagon receptors (25). We also reported that a 60-min exercise bout largely increased glucagon-induced hepatic glucose production (28). Surprisingly, however, the 30-min acute bout of aerobic exercise used in the present study did not produce any noticeable effects on glucagon receptor numbers, neither did it affect Gs_{α} protein content and $Gs_{\alpha}/Gi_{\alpha 2}$ ratio. It is possible the present 30-min exercise bout might not have been long enough to stimulate hepatic changes that facilitate glucagon action. In a recent study, an acute bout of swimming exercise for 3h in rats resulted in a large increase in receptor numbers and affinity in standard fed rats (unpublished data). It is not known, however, if such a long duration exercise may affect the HF-diet induced reduction in glucagon receptor number. The reduced Gi protein content after the present acute exercise in HF fed rats might be taken as an indication that an acute period of exercise may in fact facilitate the action of glucagon under this dietary condition.

In summary, results of the present study indicate that a HF diet-induced liver lipid infiltration results in a reduction in glucagon receptor numbers, Gs_{α} protein content, and Gs/Gi ratio. Based on the negative association between hepatic triglyceride content and glucagon receptor density, it is suggested that liver lipid infiltration plays a role in the decrease in glucagon receptor number in the liver of HF fed rats. Considering those data, it would be of interest to see if the accumulation of hepatic cytosolic triglycerides and/or circulating free fatty acids could activate the internalization of the hepatic glucagon receptors as it has been postulated for hepatic insulin receptors (16)

ACKNOWLEDGMENTS

This work was supported by grants from Natural Sciences and Engineering Research Council of Canada (NSERC)

REFERENCES

1. **Abrahamsen N, Lundgren K, and Nishimura E.** Regulation of glucagon receptor mRNA in cultured primary rat hepatocytes by glucose and cAMP. *J Biol Chem*, 1995. 270(26): p. 15853-7.
2. **Begin-Heick N.** Liver beta-adrenergic receptors, G proteins, and adenylyl cyclase activity in obesity-diabetes syndromes. *Am J Physiol*, 1994. 266(6 Pt 1): p. C1664-72.
3. **Bhathena SJ, Voyles NR, Smith S, and Recant L.** Decreased glucagon receptors in diabetic rat hepatocytes. Evidence for regulation of glucagon receptors by hyperglucagonemia. *J Clin Invest*, 1978. 61(6): p. 1488-97.
4. **Buettner R, Ottinger I, Schölmerich J, and Bollheimer C.** Preserved direct hepatic insulin action in rats with diet-induced hepatic steatosis. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 286: E828-833, 2004.
5. **Burcelin R, Mrejen C, Decaux JF, De Mouzon SH, Girard J, and Charron MJ.** In vivo and in vitro regulation of hepatic glucagon receptor mRNA concentration by glucose metabolism. *J Biol Chem*, 1998. 273(14): p. 8088-93.
6. **Caro JF, Raju MS, Caro M, Lynch CJ, Poulos J, Exton JH, and Thakkar JK.** Guanine nucleotide binding regulatory proteins in liver from obese humans with and without type II diabetes: evidence for altered "cross-talk" between the insulin receptor and Gi-proteins. *J Cell Biochem*, 1994. 54(3): p. 309-19.
7. **Charbonneau A, Couturier K, Gauthier MS, and Lavoie JM.** Evidence of hepatic glucagon resistance associated with hepatic steatosis: reversal effect of training. *Intl. J Sports Med* 2005 (in press; published on line).
8. **DebBurman SK, Ptasienski J, Benovic JL, and Hosey MM.** G protein-coupled receptor kinase GRK2 is a phospholipid-dependent enzyme that can be conditionally activated by G protein betagamma subunits. *J Biol Chem*, 1996. 271(37): p. 22552-62.
9. **Dighe RR, Rojas FJ, Birnbaumer L, and Garber AJ.** Glucagon-stimulable adenylyl cyclase in rat liver. The impact of streptozotocin-induced diabetes mellitus. *J Clin Invest*, 1984. 73(4): p. 1013-23.

10. **Drouin R, Lavoie C, Bourque J, Ducros F, Poisson D, and Chiasson JL.** Increased hepatic glucose production response to glucagon in trained subjects. *Am J Physiol*, 1998. 274(1 Pt 1): p. E23-8.
11. **Drouin R, Robert G, Milot M, Masicotte D, Péronnet F, and Lavoie C.** Swim training increases glucose output from liver perfused in situ with glucagon in fed and fasted rats. *Metabolism* 53: 1027-1031, 2004
12. **Frandsen EK, Thim L, Moody AJ, and Markussen J.** Structure-function relationships in glucagon. Re-evaluation of glucagon-(1-21). *J Biol Chem*, 1985. 260(12): p. 7581-4.
13. **Gauthier MS, Couturier K, Charbonneau A, and Lavoie JM.** Effects of introducing physical training in the course of a 16-week high-fat diet regimen on hepatic steatosis, adipose tissue fat accumulation, and plasma lipid profile. *Int J Obes Relat Metab Disord*, 2004. 28(8): p. 1064-71.
14. **Gauthier MS, Couturier K, Latour JG, and Lavoie JM.** Concurrent exercise prevents high-fat-diet-induced macrovesicular hepatic steatosis. *J Appl Physiol*, 2003. 94(6): p. 2127-34.
15. **Gettys TW, Ramkumar V, Surwit RS, and Taylor IL.** Tissue-specific alterations in G protein expression in genetic versus diet-induced models of non-insulin-dependent diabetes mellitus in the mouse. *Metabolism*, 1995. 44(6): p. 771-8.
16. **Hennes MM, Shrago E, and Kissebah AH.** Receptor and Postreceptor effects of free fatty acids on hepatocyte insulin dynamics. *Int. J Obes*. 14(10): 829-30, 1990.
17. **Hammond HK, Roth DA, McKirnan MD, and Ping P.** Regional myocardial down-regulation of the inhibitory GTP-binding protein ($G_{i\alpha 2}$) and B-adrenergic receptors in a porcine model for chronic episodic myocardial ischemia. *Clin Invest* 92: 2644-2652, 1993.
18. **Jiang G, and Zhang BB.** Glucagon and regulation of glucose metabolism. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 2003. 284(4): p. E671-8.
19. **Kahn CR, Neville DM, and Roth J.** Insulin-receptor interaction in the obese-hyperglycemic mouse. A model of insulin resistance. *J Biol Chem*, 1973. 248(1): p. 244-50.

20. **Keller U, Sonnenberg GE, Burckhardt D, and Perruchoud A.** Evidence for an augmented glucagon dependence of hepatic glucose production in cirrhosis of the liver. *J Clin Endocrinol Metab*, 1982. 54(5): p. 961-968.
21. **Krones A, Kietzmann T, and Jungermann K.** Periportal localization of glucagon receptor mRNA in rat liver and regulation of its expression by glucose and oxygen in hepatocyte cultures. *FEBS Lett*, 1998. 421(2): p. 136-40.
22. **Lam TK, Yoshii H, Haber CA, Bogdanovic E, Lam L, Fantus IG, and Giacca A.** Free fatty acid-induced hepatic insulin resistance: a potential role for protein kinase C-delta. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 283: E682-E691, 2002.
23. **Lefkowitz RJ.** G protein-coupled receptors. III. New roles for receptor kinases and beta-arrestins in receptor signaling and desensitization. *J Biol Chem*, 1998. 273(30): p. 18677-80.
24. **Lefkowitz RJ, Pitcher J, Krueger K, and Daaka Y.** Mechanisms of beta-adrenergic receptor desensitization and resensitization. *Adv Pharmacol*, 1998. 42: p. 416-20.
25. **Legare A, Drouin R, Milot M, Massicotte D, Peronnet F, Massicotte G, and Lavoie C.** Increased density of glucagon receptors in liver from endurance-trained rats. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 2001. 280(1): p. E193-6.
26. **Lewis GF, Carpentier A, Adeli K, and Garcia.** Disordered fat storage and mobilization in the pathogenesis of insulin resistance and type 2 diabetes. *Endocr Rev* 23: 201-229, 2002.
27. **Lo S, Russell JC, and Taylor AW.** Determination of glycogen in small tissue samples. *J Appl Physiol* 28: 234-236, 1970.
28. **Matas Bonjorn V, Latour MG, Bélanger P, and Lavoie JM.** Influence of prior exercise and liver glycogen content on the sensitivity of the liver to glucagon. *J Appl Physiol* 92: 188-194, 2002
29. **Murawski U, Kriesten K, and Egge H.** Age related changes of lipid fractions and total fatty acids in liver lipids and heart lipids of female and male rats aged 37-1200 days (liver) and 331-1200 days (heart). *Comp Biochem Physiol B* 1990; 96:271-289
30. **Orskov L, Alberti KG, Mengel A, Moller N, Pedersen O, Rasmussen O, Seefeldt T, and Schmitz O.** Decreased hepatic glucagon responses in type 1 (insulin-dependent) diabetes mellitus. *Diabetologia*, 1991. 34(7): p. 521-6.

31. **Pitcher JA, Fredericks ZL, Stone WC, Premont RT, Stoffel RH, Koch WJ, and Lefkowitz RJ.** Phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate (PIP₂)-enhanced G protein-coupled receptor kinase (GRK) activity. Location, structure, and regulation of the PIP₂ binding site distinguishes the GRK subfamilies. *J Biol Chem*, 1996. 271(40): p. 24907-13.
32. **Podolin DA, Wills BK, Wood IO, Lopez M, Mazzeo RS, and Roth DA.** Attenuation of age-related declines in glucagon-mediated signal transduction in rat liver by exercise training. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 2001. 281(3): p. E516-23.
33. **Pohl SL.** The glucagon receptor and its relationship to adenylate cyclase. *Fed Proc* 36: 2115-2118, 1977.
34. **Portois L, Maget B, Tastenoy M, Perret J, and Svoboda M.** Identification of a glucose response element in the promoter of the rat glucagon receptor gene. *J Biol Chem*, 1999. 274(12): p. 8181-90.
35. **Rao RH.** Adaptations in glucose homeostasis during chronic nutritional deprivation in rats: hepatic resistance to both insulin and glucagon. *Metabolism*, 1995. 44(6): p. 817-24.
36. **Samuel VT, Liu Z-X, Qu X, Elder BD, Bilz S, Belfroy D, Romanelli AJ, and Shulman GI.** Mechanism of hepatic insulin resistance in non-alcoholic fatty liver disease. *J Biol Chem* 279: 32345-32353, 2004.
37. **Strackowski M, Kowalska I, Dzieńis-Strackowska S, Kinałski M, Gorski J, and Kinałska I.** The effect of exercise training on glucose tolerance and skeletal muscle triacylglycerol content in rats fed with a high-fat diet. *Diabetes Metab*, 2001. 27(1): p. 19-23.
38. **Svoboda M, Portois L, and Malaisse WJ.** Glucose regulation of the expression of the glucagon receptor gene. *Mol Genet Metab*, 1999. 68(2): p. 258-67.

LEGENDS

Fig. 1. Plasma glucose, insulin, and glucagon concentrations in resting (Rest) and acutely exercised (Ac-Ex) rats after two weeks of a standard (SD) or a high-fat (HF) diet. Values are means \pm SE with $n = 8-10$ rats/group. ^bSignificantly different between rest and Ac-Ex groups, $P < 0.05$.

Fig. 2. Hepatic triglyceride and glycogen concentrations and plasma free fatty acid and triglyceride levels in resting (Rest) and acutely exercised (Ac-Ex) rats after two weeks of a standard (SD) or a high-fat (HF) diet. Values are means \pm SE with $n = 8-10$ rats/group. ^{aa}Significantly different between the SD and HF fed groups, $P < 0.05$; ^{aa} $P < 0.01$. ^bSignificantly different between rest and Ac-Ex groups, $P < 0.05$. ^cSignificantly different between Ac-ex groups, $P < 0.05$; ^{cc} $P < 0.01$.

Fig. 3. Glucagon receptor density (Bmax) and affinity (Kd) in resting (Rest) and acutely exercised (Ac-Ex) rats after two weeks of a standard (SD) or a high-fat (HF) diet. Values are means \pm SE with $n = 8-10$ rats/group. ^{a,a}Significantly different between the SD and HF fed groups, $P < 0.01$; ^{c,c}Significantly different between Ac-Ex groups, $P < 0.01$.

Fig. 4. Stimulatory and inhibitory α -subunits of the hepatic G-proteins ($G_{s\alpha}$ and $G_{i\alpha 2}$) and the $G_{s\alpha}/G_{i\alpha 2}$ ratio in resting (Rest) and acutely exercised (Ac-Ex) rats after two weeks of a standard (SD) or a high-fat (HF) diet. Values are means \pm SE with $n = 8-10$ rats/group. ^aSignificantly different between the SD and HF fed groups, $P < 0.05$; ^bSignificantly different between rest and Ac-Ex groups, $P < 0.05$. ^cSignificantly different between Ac-Ex groups, $P < 0.05$.

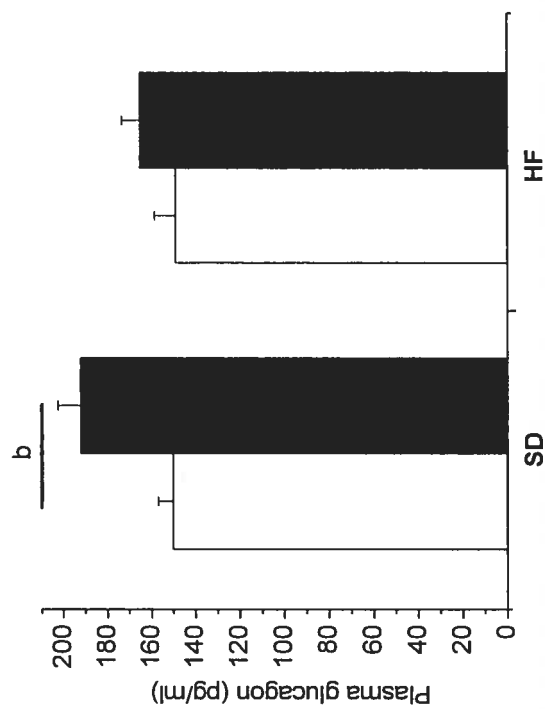
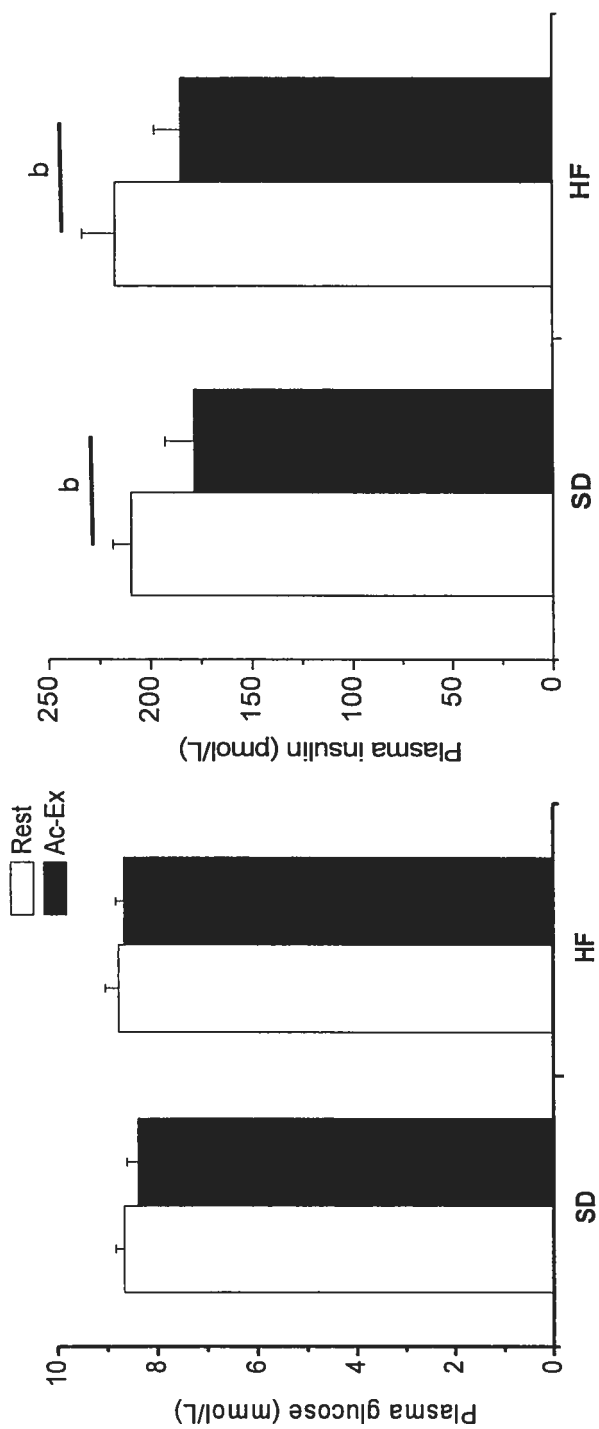
Fig. 5. Relationship between glucagon receptor density (Bmax) and liver triglycerides concentrations ($n = 32$, $P < 0.003$) for all rats in all dietary and rest-exercise conditions.

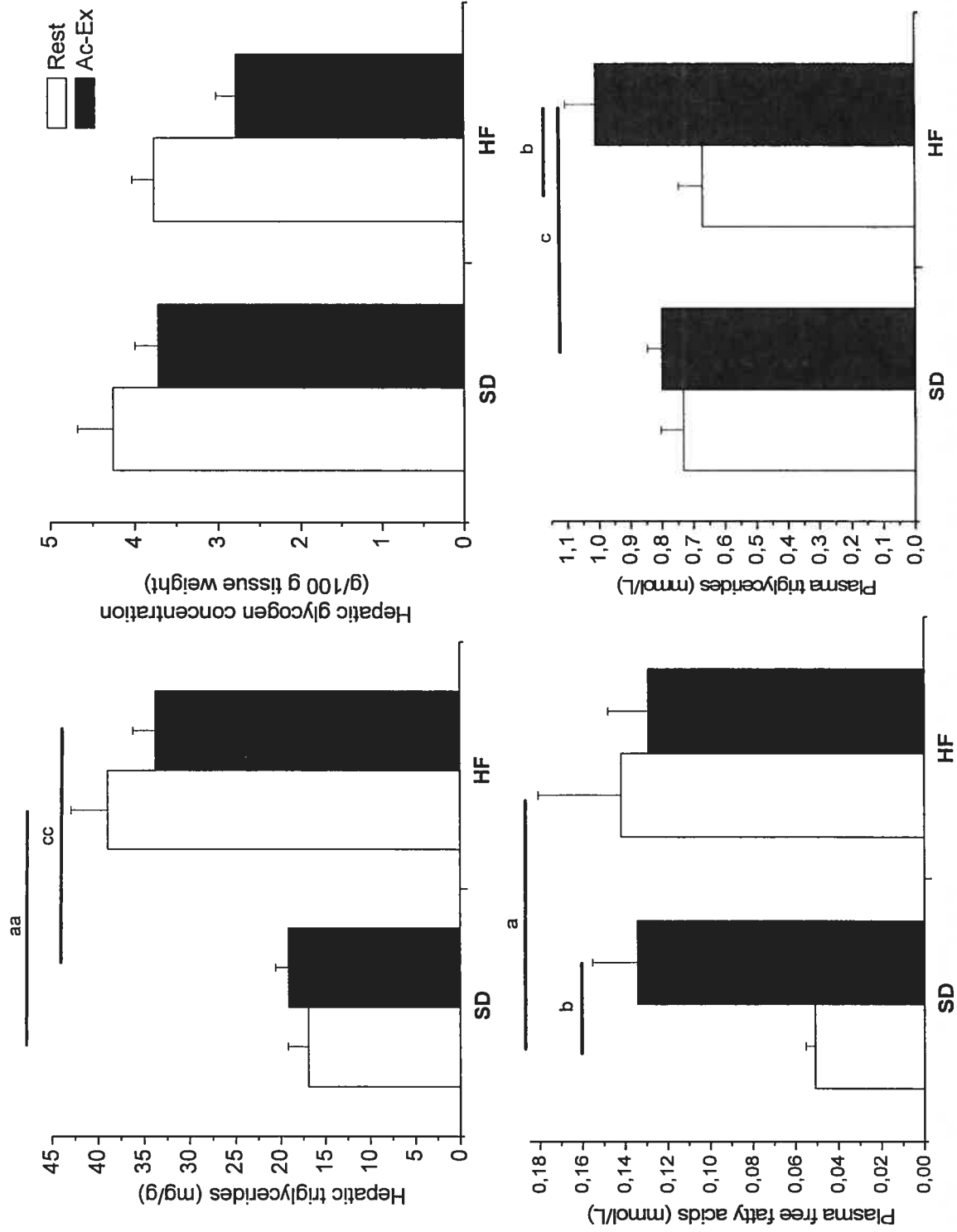
Table 1. Body weight (BW) measured at day 1, 7 and 14 of the experimental period and relative weight of fat pads and liver measured at the end of the experiment.

	SD/Rest	SD/Ac-Ex	HF/Rest	HF/Ac-Ex
Weight upon arrival(g)	186.2 ± 1.3	189.3 ± 2.2	190.9 ± 2.2	186.2 ± 1.7
Weight at day 7 (g)	215.4 ± 2.4	216.8 ± 4.9	221.9 ± 2.0	214.6 ± 3.2
Weight at day 14 (g)	239.4 ± 3.2	240.4 ± 5.2	249.8 ± 4.1	243.8 ± 4.9
Mesenteric Fat Pad (g/100 g BW)	3.0 ± 0.2	3.7 ± 0.2	5.6 ± 0.1 ^a	3.9 ± 0.2 ^b
Retroperitoneal Fat Pad (g/100 g BW)	1.9 ± 0.2	1.7 ± 0.03	3.6 ± 0.2 ^a	2.3 ± 0.2 ^{a,b}
Urogenital Fat Pad (g/100 g BW)	4.4 ± 0.2	4.2 ± 0.2	8.6 ± 0.3 ^a	6.0 ± 0.4 ^{a,b}
Liver weight (g/kg BW)	40.0 ± 1.2	37.6 ± 1.0 ^b	38.4 ± 1,4	34,9 ± 0,8 ^b

Values are reported as means ± SE (n = 8 – 10 rats/group). SD/Rest: standard diet/rest; SD/Ac-Ex: standard diet/acute exercise HF/Rest: high-fat diet/rest; HF/Ac-Ex: high-fat diet/acute exercise. ^aSignificantly different from standard-fed counterpart ($P < 0.05$). ^bSignificantly different from resting counterpart ($P < 0.05$).

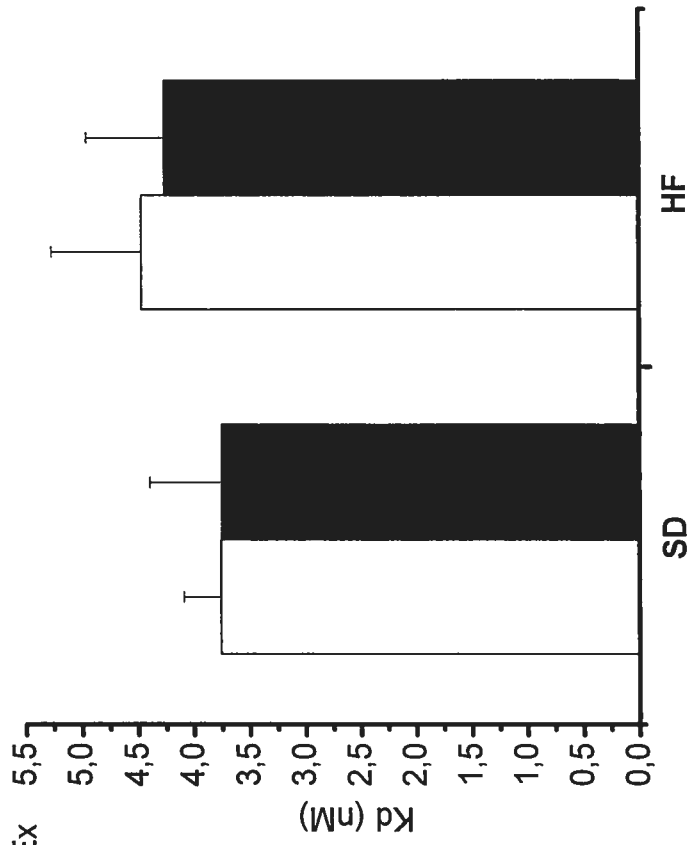
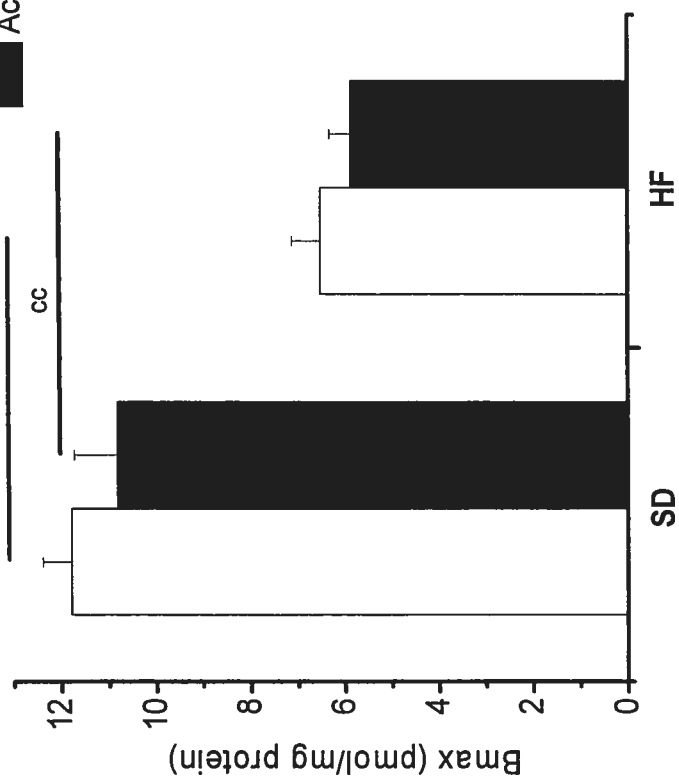
FIGURES
MANUSCRIT 2

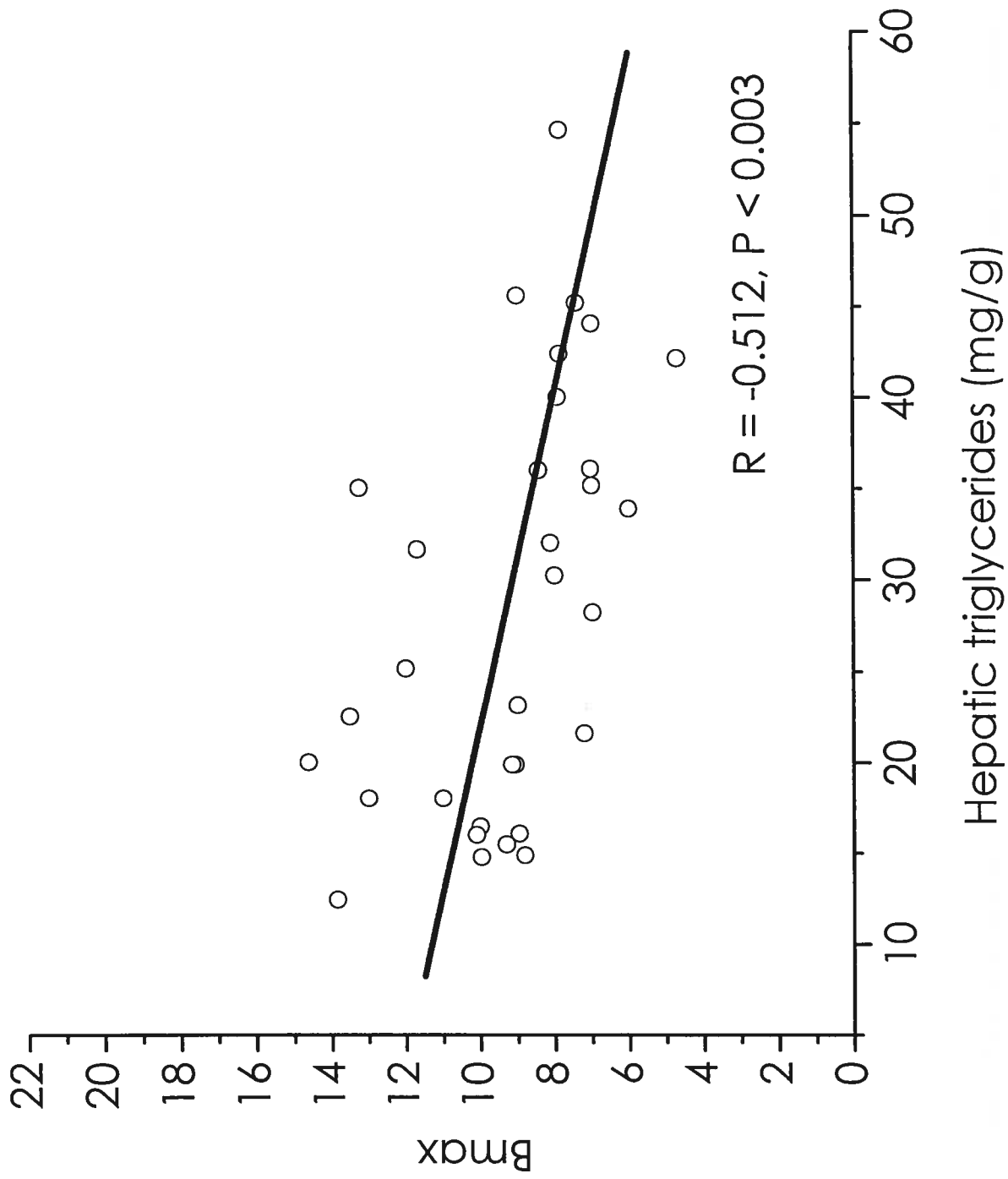


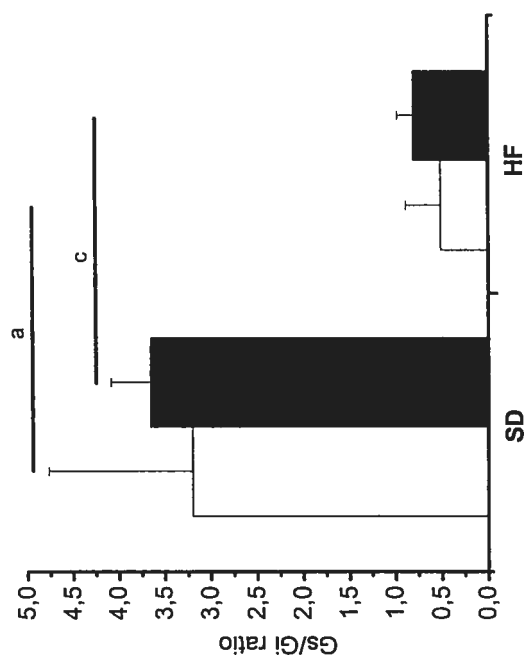
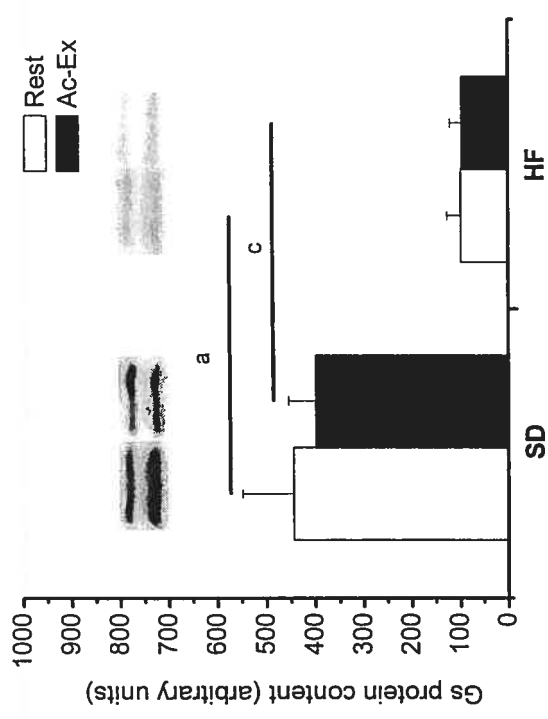
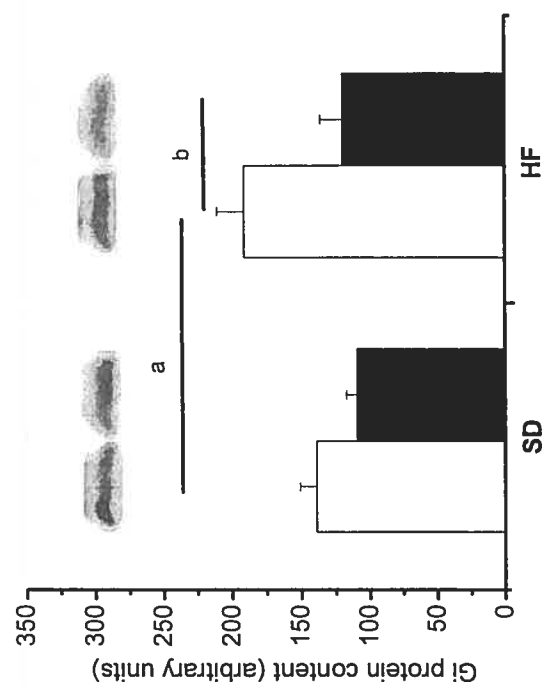


Rest
Ac-Ex

aa
cc







Chapitre 5

Manuscrit 3

Titre

Hepatic Glucagon Receptor Internalization Associated with Diet-Induced Hepatic Steatosis.

Auteurs

Alexandre Charbonneau, Cecilia G. Unson et Jean-Marc Lavoie

En préparation

SOMMAIRE

La présente étude a pour objectif de vérifier les hypothèses qu'une infiltration de lipides hépatiques induite par une diète riche en lipides 1) diminue la quantité totale de récepteurs hépatiques au glucagon (RG) en plus de celle des membranes plasmiques hépatiques 2) tout en augmentant le contenu respectif des endosomes et des lysosomes hépatiques en RG. Une troisième hypothèse est formulée voulant qu'un effort physique de 60 minutes suite à deux semaines d'une diète riche en lipides limite la désensibilisation et l'internalisation des RG. Pour une durée de deux semaines, deux groupes de rates Sprague-Dawley sont nourris avec une diète standard (SD) tandis que deux autres groupes sont nourris avec une diète riche en lipides (HF; 42% kcal). Dans les deux traitements alimentaires, un groupe de rat reste sédentaire pour la durée de l'expérience (Rest) tandis qu'un second groupe est soumis à une seule séance d'exercice en endurance sur tapis roulant d'une durée de soixante minutes (26 m/min, 0% d'inclinaison) immédiatement avant le sacrifice (Ac-Ex). La diète HF entraîne une augmentation de la concentration de triglycérides hépatiques (250%) et d'acides gras libres circulants ($P < 0.05$) en plus de diminuer (55%) significativement ($P < 0.05$) la quantité totale de RG présents dans les hépatocytes et dans les membranes plasmiques. Parallèlement, une augmentation de la présence de récepteurs au glucagon dans les fractions endosomales et lysosomales est observée chez les animaux nourris avec une diète HF. Une séance de 60 minutes d'exercice en endurance entraîne une augmentation ($P < 0.05$) des concentrations plasmatiques d'acides gras libres chez les rats nourris à la diète SD tandis qu'elle diminue ($P < 0.05$) les concentrations de glucagon et d'insuline chez les rats soumis à une diète HF. Une seule séance d'exercice en endurance de 60 minutes diminue significativement le contenu membranaire en RG lors des deux diètes, tout en augmentant la présence de RG dans la fraction endosomale des rats soumis à une diète SD. La présente étude montre que l'ingestion d'une diète HF pour une durée de deux semaines entraîne une diminution de la quantité totale et membranaire de RG. Jumelé à ces observations, une augmentation du nombre de RG est également observée dans les fractions endosomales et lysosomales des rats soumis à une diète HF. Bien que l'exercice a des effets limités sur la quantité totale et lysosomale de RG, il semble moduler la quantité de RG présent sur les membranes plasmiques des

hépatocytes. Nous croyons que l'infiltration de lipides au niveau hépatique interfère avec l'action du glucagon sur le foie en diminuant la quantité totale et membranaire de RG.

Mots-clés: Infiltration hépatique de lipides; densité et affinité du récepteur au glucagon; diète riche en lipides; foie, depots adipeux

SUMMARY

The present study was undertaken to test the hypothesis that a high-fat diet-induced liver lipid infiltration is associated with a reduction in total cellular and plasma membrane glucagon receptor (GR) content and an increase in lysosomal and endosomal internalization of the hepatic glucagon receptors. We also hypothesized that, under this dietary condition, a single bout of endurance exercise would affect GR desensitization and internalization. Male Sprague-Dawley rats were either fed a standard (SD) or a high-fat diet (HF; 40% kcal) for two weeks ($n = 20$ rats/group). Each dietary group was, thereafter, subdivided into a non-exercised (Rest) and an acute exercised group (Ac-Ex; 60 min, 26 m/min, 0% slope). The HF compared to the SD diet was associated with significantly ($P < 0.05$) higher values in hepatic triglyceride concentrations (250%), and plasma FFA concentrations. The high-fat diet also resulted in a reduction ($P < 0.05$) of total hepatic GR (55 %) and hepatic plasma membrane GR protein content. These changes were accompanied by a significant increase ($P < 0.05$) in endosomal and lysosomal GR content with the feeding of a high fat diet. The 60-min exercise bout resulted in some typical exercise effects ($P < 0.05$) such as an increase in FFA (SD diet), a decrease in insulin levels and an increase in plasma glucagon concentrations (SD and HF diet). Exercise resulted in a further decrease in hepatic plasma membrane GR content in both SD and HF diets, while it increased endosomal GR content only in the SD-fed group. The present results indicate that the feeding of a high-fat diet is associated with a reduction in total cellular and plasma membrane hepatic GR content accompanied with an increase in endosomal and lysosomal GR content. An acute bout of 60 min of aerobic exercise as limited effects on total cellular and lysosomal GR content but seems to regulate glucagon receptor content on plasma membranes. It is suggested that liver lipid infiltration plays a role in reducing glucagon action in the liver through a reduction in total cellular and plasma membrane GR content.

Keywords: liver lipid infiltration; glucagon receptor internalization; fat deposits; high-fat diet; liver

INTRODUCTION

Past studies have shown a reduction in total liver glucagon receptor (GR) number under glucagon stimulation (4, 10). A reduction in total GR has also been observed in association with several physiopathologies including liver cirrhosis, steatosis, diabetes, and malnutrition (7, 22, 30, 36). Several factors, including increased plasma glucagon and glucose concentration as well as elevated cAMP and oxygen concentrations (1, 6, 21), have been identified to explain a decrease in hepatic GR number under these circumstances. Recently, we reported a significant reduction in hepatic GR number in plasma membrane of hepatic steatotic rats without any changes in circulating glucagon concentration (7). This suggests the presence of a mechanism other than homologous desensitization to explain the reduction in plasma membrane hepatic glucagon receptors with liver lipid accumulation. Interestingly, several physiopathological conditions associated with a reduction in total hepatic GR are also associated with an increase in liver lipid infiltration. In the present study, we used an immunofluorescence technique against a specific rat glucagon receptor antibody to test the hypothesis that a high-fat diet-induced hepatic steatosis is associated with a decrease in total GR.

Normal internalization mechanisms in G protein coupled receptors (GPCR) such as the GR is initiated with plasma membranes receptors being internalized in endosomes and, thereafter, destroyed in lysosomal fractions (25, 26). Following homologous desensitization, the GR are temporarily internalized in the endosomes to minimize the stimulation effects of agonists (44). After cessation of the agonist stimulation, the receptors are recruited back to the plasma membrane. However, it is not known if liver lipid accumulation results in an increased internalization of the GR in endosomes. Under chronic stimulation of the receptors, internalization results in GR destruction in lysosomes (25, 26). It is possible that the presence of liver triglycerides could redirect normal GPCR internalization in endosomes to lysosomal compartments (25, 26). This would result in a reduction in GR availability to normal physiological processes and partly explain the lower hepatic glucose production in response to a hyperglucagonemic clamp previously observed in hepatic steatotic rats (8). Therefore, the second aim of the present study was to test the hypothesis that, in

addition to a decrease in total GR, liver lipid infiltration is also associated with an increase in endosomal and lysosomal internalization of the hepatic GR.

Opposite to several pathophysiological conditions (4, 10, 22, 30, 36), chronic and acute physical exercise have been associated with increased glucagon action in the liver. Drouin et al. (12, 13) reported that under glucagon stimulation, trained individuals and animals depicted higher hepatic glucose production than sedentary counterparts. Similarly, Légaré et al. (27) and Podolin et al. (32) demonstrated that endurance training increases plasma membrane hepatic GR number in rats. There is also evidence that not only chronic but also acute exercise (60 min) may enhance hepatic glucose production in response to glucagon (29). Although the exact mechanism remains unknown, there is no doubt that the liver can rapidly adapt to physiological stress through modulation of GR binding characteristic and internalization processes. In our previous study, using a 30 min acute exercise protocol, we were unable to determine any significant effects of acute exercise on GR number and binding capacity (7). This was attributed to the short duration of the exercise protocol. In the present study, we utilized 60 min of acute exercise to physiologically stimulate the glucagon receptors in a attempt to see if the dynamic response of the GR to glucagon is altered by exercise in a condition of liver lipid accumulation. Therefore, the third aim of the present study was to assess the effects of acute exercise on glucagon receptor internalization under a condition of high-fat diet-induced hepatic steatosis.

MATERIALS AND METHODS

Animal care and exercise protocol. Male Sprague-Dawley rats (Charles River, St. Constant, Canada), weighing 180-200 g, were housed individually and allowed food (standard diet or high-fat diet) and water *ad libitum* for 2 weeks after they were received in our laboratory. The lighting schedule was such that lights were on from 0700 until 1900, and room temperature was maintained at 20-23°C. Seven days after their arrival, rats assigned to acutely exercised groups underwent a habituation running protocol on a motor-driven rodent treadmill (Quinton Instruments, Seattle, WA) consisting of three sessions over a 7-day period beginning with 15 min/day at 20 m/min and progressively increased to 60 min/day at 26 m/min (0% grade), so that they were well-accustomed to running and being handled. The last habituation session was held 2 days before the experiment for all rats. All exercised animals (Ex) were restrained from exercise 48h before the experimentation. All protocols were in accordance with the directives of the Canadian Council of Animal Care.

Groups and surgery. After their arrival, rats were randomly assigned to one of the eight experimental groups. One group of rats were fed with standard (SD) pellet rat chow (12.5% lipids, 62.3% carbohydrate, and 24.3 % protein; kcal; Agribrands Purina Canada, Woodstock, Ontario). A second group of rats were fed with high-fat (HF) small pellet rat chow (42% lipids: (80% lard, 20% corn oil); 36% carbohydrate, and 22% protein (kcal); ICN Pharmaceuticals, NY, USA). The duration of the diet (2 wks) was based on previous time course studies (18, 19) in which we observed that hepatic triglyceride content was highest 2 wks after the initiation of a high-fat diet. Details of the diets are described elsewhere (17, 19). Rats in each dietary condition were thereafter assigned either to a rested group (Rest), an exercised group (Ex). On the day of the experimentation, rats assigned to exercise groups ran 60 minutes at 26 m/min before termination.

The eight experimental groups were duplicated and used as follow: the first eight groups were assigned to membrane, endosomes and lysosomes isolation protocol (Protocol A) along with blood samplings while the second eight groups were assigned to the perfusion protocol (Protocol B). Because it is impossible to

isolate liver organelles after collagenase perfusion, a duplicate of the initial eight groups was obligatory. On the morning of the experiment, any remaining food was removed from the cages 2-3h before sacrifice for the groups not submitted to an overnight fast. After the assigned treatment (rest, fasting, exercise and fasting + exercise), rats were weighed and anesthetized with pentobarbital (40 mg/kg ip). After complete anaesthesia the abdominal cavity was rapidly opened following the median line of the abdomen.

Protocol A. Organelles isolation, plasma and tissue data.

Blood was rapidly (< 45 s) drawn from the abdominal vena cava (~4 ml) into a syringe pre-treated with EDTA (15%). The fraction of blood (250 ul) to be used for glucagon determination was preserved in aprotinin (25 ul) before centrifugation. The remaining fraction of blood was also centrifuged (Eppendorf centrifuge, no. 5415), and the plasma was stored for subsequent plasma glucose, insulin, triglyceride, and free fatty acid determinations. The liver was excised and weighed. The liver median lobe was freeze-clamped and used for glycogen and triacylglycerol determinations, while 4 g of fresh liver was used for membrane isolation.

Materials and isolation of plasma membranes, endosomes and lysosomes. Sucrose (ultra-pure) was obtained from Schwarz/Mann Div. Becton, Dickson and Co (Orangeburg, NY); p-nitrophenyl thymidine mono-phosphate, cytochrome c, glucose-6-phosphate (Na salt), alkaline phosphatase substrate, p-nitrophenyl- β -N-acetyl glucosaminide, agarose, and Tris base from Sigma Chemical Co. (St.-Louis, MO); protein reagent from Bio-Rad Laboratories (Richmond, CA); 5'-adenosine monophosphate (5'AMP), NADPH, NADH, and ferritin (A grade) from Calbiochem-Behring Corp. (American Hoescht Corp., San Diego, CA); N.N-dimethyl-1, 3-propane diamine from Eastman Organic Chemicals Div., Eastman Kodak CO (Rochester, NY); glutaraldehyde and osmium tetroxide (OsO₄) from Electron Microscopy Sciences (Fort Washington, PA); and 1-ethyl-3 (3-dimethyl aminopropyl) carbodiimide hydrochloride (EDC) from Ott Chemical CO (Muskegan, MI). All other chemicals were reagent grade. All sucrose solutions were prepared 24-48 h before use and their densities determined at room temperature with an Abbé refractometer. The sucrose solutions were filtered (0.22 μ m for 0.25 M and

1.2 μm for 1.42 and 2.0 M solutions), the pH and density determined, and stored at 4°C.

Liver samples (1.8 -2 g) were weighed, added to 10 volumes of 0.25 M sucrose in a 15 ml glass disposable culture tube (0.25 M sucrose/5 mM Tris HCl, pH 7.2 – 7.6/0.5 and 1.0 mM MgCl_2) and homogenized with a Polytron (Polyscience, model X-520) at 1000-1100 rpm. The solution was centrifuged (25–30 ml per 50 ml plastic tube) at 280 g or 1,800 rpm for 5 min (Beckman GPR centrifuge). The supernatant was saved and the pellet was resuspended in 0.25 M STM to one-half the initial homogenate volume. The suspension was again centrifuged as above. The first and second supernatants were combined and centrifuged at 1,500 g or 2,600 rpm for 10 min. The resulting pellets were pooled and resuspended in 1–2 ml of 0.25 M sucrose per g of liver (initial wet weight). A sucrose gradient consisting of three sucrose phase was performed in beckman cellulose nitrate tubes. The bottom phase consisted of a 68.4% sucrose concentration with sufficient volume to bring to approximately twice that of the original homogenate (i.e. 10% w/vol). The second phase consisted of a 2ml 45% sucrose concentration with finally a 2ml 36% sucrose concentration phase. The combined supernatants resuspended in 1-2 ml of 0,25M sucrose was poured over the sucrose gradients and overlaid with 2-4 ml of 0.25 M sucrose. After centrifugation for 90 min at 141,000 g (41,000 rpm) in a Beckman ultracentrifuge (model L5-50), the pellicles at the interfaces of each sucrose gradients were collected with a blunt-tipped Pasteur pipette and resuspended in 0.25 M sucrose to obtain a density of 1.05 g/cm^3 . The pellicle at the interface of the 36% and 0,25 M of sucrose represented the lysosomal fraction, while the pellicle at the interface 45%-36% represented the endosomal fraction. The bottom interface pellicle (68%-45%), represented the plasma membranes. Those suspensions were centrifuged at 14000 rpm for 10 min and the final pellet was resuspended in anti-protease (1ml) (Mini complete, Roche Pharmaceuticals) and stored at -78°C for further analysis.

Preparation for SDS-PAGE immunoblotting. Plasma membranes, endosomal and lysosomal fractions homogenates were vortexed frequently for 1 h at 4°C then centrifuged at 4500 g for 1h at 4°C. The protein concentration of the supernatant was measured using a Bradford protein assay (Bio-Rad). Plasma membranes, endosomal

and lysosomal fractions lysates containing 100 μ g of protein were prepared for SDS-PAGE by dilutions with reducing sample buffer (laemli) followed by a 2-min immersion in near-boiling water.

Quantification of glucagon receptor by immunoblotting. Assessment of the glucagon receptor was conducted using standard SDS-PAGE and immunoblotting techniques. Briefly, all samples were electrophoresed, transferred to nitrocellulose membranes, incubated with purified polyclonal rabbit anti-sera primary antibodies (ST-18). Thereafter, identification using goat anti-rabbit IgG conjugated to horseradish peroxidase was performed (no. 305-065-003; Jackson laboratory). To quantify hepatic glucagon receptor and to ensure equal lane loading, purified fusion proteins were constructed as previously described (32) and the protein standard and sample band at 64 kDa was quantified. All gels were poured so that samples from each of the experimental groups were always electrophoresed on the same gels to ensure standardized Western blotting analysis. Glucagon receptors were visualized with chemiluminescent solutions A and B (Amersham, Alameda, CA). Image capture analysis was performed on the fusion proteins to quantify GR in all membrane, endosomal and lysosomal samples.

Analytical methods. Plasma glucose concentrations were determined by using a glucose analyser (Yellow Springs Instruments 2300, Yellow Springs, OH). Insulin and glucagon concentrations were determined by commercially available radioimmunoassay kits (Radioassay System Laboratory, ICN Biomedicals, Costa Mesa, CA; distributed by Immunocorp, Montréal, Québec, Canada). Plasma and liver triglyceride concentrations were determined by quantitative enzymatic method (Sigma Diagnostics, St. Louis, MO). FFA concentrations were determined by enzymatic colorimetric assay (Roche Diagnostics, Laval, Québec, Canada). Liver glycogen concentrations were determined by using the phenolsulfuric acid reaction (28).

Protocol B. Isolation of Hepatocytes.

Hepatocyte isolation was performed according to the technique described by Berry et al. (3) with minor modifications. Briefly, the portal vein and the superior vena cava were cannulated with blunted needles (18 gauge) for selective anterograde and retrograde perfusion. Both needles were positioned to rest 1 cm from the liver. The liver was perfused in open circuit in the anterograde direction at 37°C, pH 7.4, with saturated (95% O₂-5% CO₂) perfusion medium at a rate of 25 ml/min for 5 min using a peristaltic pump (Cole Parmer Instrument, Vernon Hills, IL). The perfusion medium consisted of (in mM) 24 NaCl, 4.8 KCl, 1.2 KH₂PO₄, 1.2 MgSO₄ (7H₂O), and 0.05 NaHCO₃. Thereafter, collagenase (CLS-1, 262 U/mg, Worthington Biochemical), 0.3 % in perfusion medium supplemented with 1.3 mM CaCl₂, was infused at a rate of 40 ml/min for 25 min to achieve liver digestion. Digestion was considered complete when gentle finger pressure on a liver lobe resulted in fracture of the liver surface (3). The liver was thereafter excised and transferred to a petri dish where it was gently disrupted with forceps. The cell solution was filtered through a nylon mesh and centrifuged twice for 2 min at 600 rpm, and the supernatant was discarded. Finally, cells were resuspended in a Falcon tube with 8-10 ml of ice-cold perfusion medium supplemented with 1.3 mM CaCl₂ and 1% BSA. The upper part of the tube was gassed for 2 min with 95% O₂-5% CO₂ and left on ice for 1 h before incubation. Hepatocytes were incubated at 10 mg/ml dry weight estimated from the weight of the wet-packed cells (dry weight 5 wet weight/3.8; Ref. X) in closed vials saturated with 95% O₂-5% CO₂ in a final volume of 2.8 ml [in mM: 24 NaCl, 4.8 KCl, 1.2 KH₂PO₄, 1.2 MgSO₄ (7H₂O), and 0.05 NaHCO₃, 1.3 CaCl₂, pH 7.4, 37°C]. The dry weight of each hepatocyte preparation was subsequently determined by allowing a precise amount (500 ml) of the hepatocyte solution to dry out for 2 days in a warm dry area. The dry weight values of each hepatocyte preparation were subsequently used in the calculations.

Cell viability. The exclusion of trypan blue by intact cells is a commonly used method to distinguish between intact and damaged cells (3). The test of exclusion of trypan blue was run on each individual sample to obtain a rapid estimation of the cell viability.

Immunofluorescence microscopy of isolated hepatocytes with ST-18 antibody. After hepatocytes isolation, cells were placed overnight on coverglasses pre-treated with AES (3-Aminopropyltriethoxy-silane, Sigma, A-3648) disposed in a 15 well-plate apparatus where all subsequent incubations were performed. Thereafter, the medium was aspirated and cells were washed twice with a phosphate-buffered solution (137 mM NaCl, 8.0 mM Na₂HPO₄, 2.7 mM KCl, 1.5 mM KH₂PO₄). One ml of 3% paraformaldehyde in Buffer B (150 mM NaCl, 10 mM Na₂HPO₄, 2 mM MgCl₂, pH 7.4) was poured in each well for 40 min and cells were then washed twice in Buffer B for 5 min. Cell permeabilization, was carried out by treatment with 1 ml of 0.2% Triton X-100 in Buffer B for 15 min at 4 °C. After washing the cells twice with Buffer B for 5 min, nonspecific binding sites were blocked with 1% bovine serum albumin in Buffer B for 40 min at room temperature, followed by incubation at room temperature for 1 h with 0.5 ug of ST-18 antibody in 0.1% bovine serum albumin in Buffer B. Three washes in 1 ml of Buffer B for 10 min each were followed by incubation at room temperature with 0.5 ug of Alexa Fluor 633 goat anti-rabbit IgG (Molecular Probes) diluted in 0.1% bovine serum albumin in Buffer B. All incubations and washes were performed subsequently in the dark. After washing three times in Buffer B for 10 min, coverglasses were blotted on kimwipes and mounted on slides with Mowiol (Polyvinyl Alcohol 4-88, Fluka). All cells were viewed with a Nikon Microphot-SA epifluorescence microscope. Images were photographed at 1000-fold magnification with a motorized FX-35DX dark box connected to a Nikon Microflex UFX-DX photomicrographic attachment using Kodak Ektachrome ISO 400 35-mm film. The exposure time for each image was determined automatically by the photomicrographic attachment, except for the nonpermeabilized mutants where no positive staining was seen. For these images, the shutter was opened manually for the same duration as that determined automatically for the corresponding permeabilized sample.

Statistical analysis. All data are reported as means \pm SE. Statistical comparisons were performed by using a two-way ANOVA for non-repeated measures design. Newman Keuls post hoc test was used in the event of a significant ($P < 0.05$) F ratio.

RESULTS

There was no difference in body and liver weight between groups upon arrival and at the end of the experiment (Table 1).

The feeding of a high fat diet did not significantly alter plasma glucose concentrations in the rested state (Fig. 1). Exercise, however, resulted in significantly lower plasma glucose concentrations in the standard fed group. Following the high fat diet, plasma insulin concentrations were significantly higher compared to its standard fed counterpart ($P < 0.05$) (Fig.1). Plasma insulin concentrations were significantly lower after exercise in both standard and high-fat groups ($P < 0.05$). No differences in plasma glucagon concentration were observed between the standard and high-fat fed rats in both rested and exercised conditions (Fig 1; $P > 0.05$). Concomittantly, the high fat regimen did not significantly alter plasma insulin to glucagon ratio in all groups (Fig 1; $P > 0.05$). Exercise resulted in similar higher plasma glucagon concentration and lower insulin to glucagon ratio in both standard and high fat groups ($P < 0.05$).

As expected, hepatic triglyceride concentrations were significantly ($P < 0.01$) higher with the feeding of the high-fat diet (Fig.2). Liver triglyceride levels increased by ~250 % ($P < 0.05$) in the rested group following the high fat diet. Exercise resulted in a significant decrease of hepatic triglyceride concentrations only in the HF-Ex group ($P < 0.05$). The feeding of a high fat diet only resulted in a significant increase of plasma free fatty acid concentrations in the rested and exercised groups ($P < 0.05$). Exercise resulted in a significant increase in FFA concentrations in the standard fed regimen (Fig 2; $P < 0.05$). Although exercise resulted in a lower hepatic glycogen concentration, no differences were observed between the standard and high-fat diet in all groups ($P > 0.05$).

In agreement with our hypothesis, total hepatic glucagon receptor, assessed by immunohistofluorescence, was significantly ($P < 0.01$) reduced with the feeding of a high fat diet (Fig. 3 and 5). A ~55% lower total GR was observed in all HF fed groups. The feeding of a high fat diet resulted also in a significant ($P < 0.05$) decrease in plasma membrane GR in the rested and exercise groups (Fig 3). Exercise resulted in a significant decrease in plasma membrane GR in both standard and high

fat fed groups (Fig 3; $P < 0.05$). The presence of the GR in the endosomal fraction was significantly higher (~300%) following the high fat diet (Fig 4; $P < 0.05$). In the standard fed groups, exercise resulted in a significant increase in endosomal GR ($P < 0.05$). Despite a weak signal, we were able to distinguish a significant increase in lysosomal GR content after the feeding of a high fat diet, with no effect of exercise (Fig 4; $P < 0.05$). Because lysosomes carry hydrolases that degrade nucleotides, proteins, lipids, phospholipids, and also remove carbohydrate, sulfate, or phosphate groups from molecules, we hypothesize that this is the explanation for the low signals obtain on the western blots for the lysosomal GR. The lysosomes content might have degraded the intracellular C-terminal tail where the ST-18 antibody binds.

DISCUSSION

The present HF diet regimen in rats resulted in a 250% higher fat accumulation in liver compared to the SD fed animals (Fig. 2). Our results corroborate those observed in previous studies (7, 17, 18, 41). The duration of the high-fat feeding in the present study is based on the observation that two weeks of high fat feeding is adequate to cause a substantial accretion of fat inside the liver that is compatible with the development of a state of hepatic steatosis (17, 19). In addition to liver lipid infiltration, the present HF diet resulted in a 3 fold increase in plasma free fatty acids concentration. In previous studies in which hepatic steatosis was induced by high-fat diets, a substantial increase in plasma FFA was constantly observed (17, 18, 19, 41). It has been suggested that the increased delivery of fatty acids to the liver could result in a higher uptake by the liver, since FFA uptake is mostly done in a concentration-dependant manner. Taking together, the increased plasma FFA levels following the present high-fat diet are consistent with a metabolic situation leading the development of a state of hepatic steatosis.

The major finding of the present investigation is that a high-fat diet-induced liver lipid infiltration is associated with a ~55% reduction in total cellular hepatic GR. This reduction in total GR cellular components was accompanied by a 20 % lower plasma membrane level of GR protein content along with a 300% and 200% increase in endosomal and lysosomal GR protein content, respectively. In a previous study (7), we reported that liver lipid infiltration was associated with a reduction in glucagon receptor number (B_{max}) by 45%. The present data extend this observation by being the first to indicate that the decrease in total and plasma membrane GR is accompanied by an increase in glucagon receptor protein content in microvesicular bodies in an *in vivo* high-fat model of hepatic steatosis in rats.

The feeding of a high fat diet resulted in a significant increase in internalization of the GR in microvesicular bodies. GR protein content in endosomal and lysosomal fraction increased respectively by 31 and 55% respectively in our *in vivo* model of hepatic steatosis. It has been postulated, in past studies, that the decrease in the total cellular components of GPCR's such as the GR results from decreased mRNA and protein synthesis and increased lysosomal degradation of pre-existing receptors (15). In the present study, we did not assess mRNA expression of

the GR and its protein synthesis to determine whether the reduction observed in total and plasma membrane GR were due to transcriptional processes. On the other hand, our increase in endosomal and lysosomal GR is an indicator of an increase desensitization in our model of liver lipid infiltration. As for GR degradation, the only evidence of a downregulation of total GR in a state of liver lipid accumulation is given by the results obtained with the immunofluorescence technique against isolated hepatocytes for the assesment of total GR. Whether hepatic lipids or other factors mediate this GR downregulation remains to be elucidated.

Recently, our group reported a reduction in hepatic plasma membrane GR number (B_{max}), assessed by binding assay, in an *in vivo* model of hepatic steatosis (7). In the present study, we used a specific rat antibody for the intracellular C-terminal of the hepatic glucagon receptor (ST-18). The rationale behind the use of this antibody instead of the high affinity binding assay is based on the following observations. First of all, binding assays are only useful when the radioligand has a high affinity for the receptor. If the receptor as a low affinity for the radioligand utilized, binding is minimized. Therefore, assessment of total and organelle receptor content is diminished. Furthermore, binding assays are based on the law's of mass action that states that all receptors are 1) equally accessible to ligands (the model ignores any states of partial binding); and that 2) neither ligand nor receptor are altered by binding; and that 3) binding is reversible. Physiopathologies such as hepatic steatosis, diabetes, and obesity cause alterations in receptor structural integrity as well as receptor kinetics that can affect the law of mass action (14). In those conditions, changes in receptor binding capacities by binding assays might not reflect the changes in protein content of the same receptors: receptors could have structural damage or changes that would limit binding capacities. Using an immunofluorescence and immunoblotting techniques we confirmed that a ~55% reduction in total GR cellular components was accompanied with a 20 % lower plasma membrane level of GR protein content along with a 300% and 200% increase in endosomal and lysosomal GR protein content in a model of liver lipid accumulation.

In vivo and *in vitro* studies indicate that GR mRNA expression and the number of glucagon receptors expressed in the liver can be down-regulated by glucagon itself (4, 10, 35, 38, 39, 40). However, one has to remember that an

increase in the expression of glucagon receptor mRNA does not necessarily signify the formation of glucagon receptors. Accordingly, it has been suggested that glucagon receptor expression is modulated at a step after mRNA formation (45). The mechanism involved in this glucagon-induced down-regulation of its own receptors, however, has not been established. A reduction in liver glucagon receptor number in diabetes could explain in part that, under stimulation with glucagon, liver glucose production is significantly lower in diabetic patients than in healthy subjects (30). In the present study, plasma glucagon levels were not increased by the present dietary manipulation and therefore, cannot explain the ~50% decrease in total glucagon receptor numbers observed in the high-fat fed rats. GR mRNA expression has been reported to be upregulated in presence of increasing concentrations of glucose and insulin (1, 6, 34, 42). Similarly to plasma glucagon concentrations, plasma insulin and glucose concentrations in the present study can hardly be associated with any changes in glucagon receptor number with the high-fat feeding.

Data from the present study do suggest that factors related to the HF-diet-induced hepatic steatosis are involved in the reduction in total cellular and plasma membrane GR, as well as the increase in endosomal and lysosomal GR. It is not clear, however, if the present HF-diet-induced "GR internalization" is due to systemic factors (i.e. circulating lipids) or to elevated intrahepatic triglycerides. In a recent study conducted on isolated livers from HF fed rats, it was concluded that hepatic insulin resistance observed *in vivo* may at least partially result from circulating factors (5). Plasma FFA levels were largely increased by the present HF diet and may, at least partly, explain the GR desensitization. On the other hand, Samuel et al. (37) recently used a 3 day high-fat diet model to increase liver triglyceride content (3 folds), without the confounding effects of peripheral fat accumulation. They provided evidence to support the causal relationship between hepatic fat accumulation and hepatic insulin resistance. In our previous studies (7, 8) a negative association was found between hepatic triglyceride concentrations and glucagon receptor density (B_{max}), supporting the reduction in glucagon stimulated hepatic glucose production. The precise mechanism(s) by which high-fat diet and/or hepatic lipids would reduce hepatic glucagon receptor number remains to be elucidated. In past studies, fat-induced hepatic insulin resistance has been attributed to impaired insulin-stimulated IRS-1 and IRS-2 tyrosine phosphorylation associated

with activation of some isoforms of PKC (22, 35). The activation of PKC by hepatic lipids, in the form of phospholipids, leads to phosphorylation of G-coupled receptor kinases (8, 31). Activation of G-protein receptor kinase proteins is known to desensitize G protein-coupled receptors and their subsequent internalization in microvesicular organelles such as endosomes and lysosomes (25, 26). Whether the accumulation of cytosolic triglycerides could lead to higher phospholipid content in the liver and desensitize the GR through activation of such proteins remains to be determined.

An interesting finding in the present study is that a 60-min acute bout of aerobic exercise resulted in a significant decrease in plasma membrane GR in both standard and high fat diets as well as increasing GR content in endosomal fractions. In the present study, rats were submitted to an acute period of exercise to stimulate the hepatic GR under physiological conditions and thereby to test the possibility that various glucagon secreting stimuli may alter the total cellular and organelles GR. In previous studies, exercise training was shown to increase hepatic glucagon receptors density (27). We also reported that a 60-min exercise bout largely increased glucagon-induced hepatic glucose production (29). The present results suggest that an acute bout of 60 min exercise increases GR internalization without affecting total cellular GR. We, therefore, hypothesize that a 60 min acute exercise bout results in an homologous desensitization of the GR without a subsequent destruction of the GR. Exercise did not cause any changes in total cellular GR: although chronic exercise increase plasma membrane glucagon receptor density (27), acute exercise potentially results in GR internalization to protect the energy supplies of the liver from being depleted by a prolonged action of glucagon. For a reason still unknown, this desensitization by exercise seems to be exacerbated by the heterologous desensitization cause by conditions related to hepatic steatosis.

In summary, results of the present study indicate that a HF diet-induced liver lipid infiltration results in a reduction in total cellular and plasma membrane GR, as well as an increase in endosomal and lysosomal GR. In addition, a 60-min acute bout of aerobic exercise reduced significantly plasma membrane GR in both standard and high fat diets as well as increasing GR content in endosomal fractions without affecting total cellular GR. The increased desensitization mechanisms seen in the HF fed rats were exacerbated when exercise was introduced. We therefore

hypothesize that both homologous and heterologous mechanisms might play a role in the aforementioned results observed in the present study. Based on past studies (7, 8) and the present data, it is suggested that liver lipid infiltration plays a role in the desensitization and internalization of the GR in the liver of HF fed rats. Considering these data, it would be of interest to see if the accumulation of hepatic cytosolic triglycerides and/or circulating free fatty acids could activate second messenger protein kinases (cAMP-dependent protein kinase, PKA), G protein coupled receptor kinase (GRK's), arrestins proteins (β -arrestins) and mediate hepatic GR desensitization mechanisms in hepatic steatosis.

Acknowledgements

This work was supported by grants from Natural Sciences and Engineering Research Council of Canada (NSERC)

REFERENCES

1. **Abrahamsen N, Lundgren K, and Nishimura E.** Regulation of glucagon receptor mRNA in cultured primary rat hepatocytes by glucose and cAMP. *J Biol Chem*, 1995. 270(26): p. 15853-7.
2. **Authier F, Desbuquois B, De Galle B.** Ligand-mediated internalization of glucagon receptors in intact rat liver. *Endocrinology*. 1992.131(1): p. 447-57.
3. **Berry, M.N., Edwards, A.M. and Barritt, G.J.** Isolated hepatocytes, preparation, properties and applications: Laboratory Techniques in Biochemistry and Molecular Biology Elsevier Science Publishers, Amsterdam, The Netherlands, 1991, 460 pages
4. **Bhathena SJ, Voyles NR, Smith S, and Recant L.** Decreased glucagon receptors in diabetic rat hepatocytes. Evidence for regulation of glucagon receptors by hyperglucagonemia. *J Clin Invest*, 1978. 61(6): p. 1488-97.
5. **Buettner R, Ottinger I, Scholmerich J, Bollheimer LC.** Preserved direct hepatic insulin action in rats with diet-induced hepatic steatosis. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. 2004. 286(5): p. E828-33.
6. **Burcelin R, Mrejen C, Decaux JF, De Mouzon SH, Girard J, and Charron MJ.** In vivo and in vitro regulation of hepatic glucagon receptor mRNA concentration by glucose metabolism. *J Biol Chem*, 1998. 273(14): p. 8088-93.
7. **Charbonneau A, Melancon A, Lavoie C, and Lavoie JM** Alterations in hepatic glucagon receptor density and in G α and G α 2 protein content with diet-induced hepatic steatosis: effects of acute exercise. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. 2005 Jul;289(1): p. E8-14.
8. **Charbonneau A, Couturier K, Gauthier MS, and Lavoie JM.** Evidence of hepatic glucagon resistance associated with hepatic steatosis : reversal effect of training. *Intl. J Sports Med* 2005. 26(6): p. 432-41.
9. **DeBurman SK, Ptasienski J, Benovic JL, and Hosey MM.** G protein-coupled receptor kinase GRK2 is a phospholipid-dependent enzyme that can be conditionally activated by G protein betagamma subunits. *J Biol Chem*, 1996. 271(37): p. 22552-62.

10. **Dighe RR, Rojas FJ, Birnbaumer L, and Garber AJ.** Glucagon-stimulable adenylyl cyclase in rat liver. The impact of streptozotocin-induced diabetes mellitus. *J Clin Invest*, 1984. 73(4): p. 1013-23.
11. **Doss RC, Perkins JP, Harden TK.** Recovery of beta-adrenergic receptors following long term exposure of astrocytoma cells to catecholamine. Role of protein synthesis. *J Biol Chem*, 1981. 256(23): p. 12281-6.
12. **Drouin R, Lavoie C, Bourque J, Ducros F, Poisson D, and Chiasson JL.** Increased hepatic glucose production response to glucagon in trained subjects. *Am J Physiol*, 1998. 274(1 Pt 1): p. E23-8.
13. **Drouin R, Robert G, Milot M, Masicotte D, Péronnet F, and Lavoie C.** Swim training increases glucose output from liver perfused in situ with glucagon in fed and fasted rats. *Metabolism*, 2004. 53: p. 1027-1031.
14. **Feldman HA.** Mathematical theory of complex ligand-binding systems at equilibrium. *Analyt Biochem*, 1972. 48: p. 317-338
15. **Ferguson SS, Caron MG.** G protein-coupled receptor adaptation mechanisms. *Semin Cell Dev Biol*, 1998. 9(2): p. 119-27. Review.
16. **Frandsen EK, Thim L, Moody AJ, and Markussen J.** Structure-function relationships in glucagon. Re-evaluation of glucagon-(1-21). *J Biol Chem*, 1985. 260(12): p. 7581-4.
17. **Gauthier MS, Favier R, and Lavoie JM.** Time course of the development of non-alcoholic hepatic steatosis in response to high fat diet-induced obesity in rat. *British Journal of Nutrition* (in press)
18. **Gauthier MS, Couturier K, Charbonneau A, and Lavoie JM.** Effects of introducing physical training in the course of a 16-week high-fat diet regimen on hepatic steatosis, adipose tissue fat accumulation, and plasma lipid profile. *Int J Obes Relat Metab Disord*, 2004. 28(8): p. 1064-71.
19. **Gauthier MS, Couturier K, Latour JG, and Lavoie JM.** Concurrent exercise prevents high-fat-diet-induced macrovesicular hepatic steatosis. *J Appl Physiol*, 2003. 94(6): p. 2127-34.
20. **Hennes MM, Shrago E, and Kissebah AH.** Receptor and Postreceptor effects of free fatty acids on hepatocyte insulin dynamics. *Int. J Obes*, 1990. 14(10): p. 829-30.

21. **Jiang G, and Zhang BB.** Glucagon and regulation of glucose metabolism. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 2003. 284(4): p. E671-8.
22. **Keller U, Sonnenberg GE, Burckhardt D, and Perruchoud A.** Evidence for an augmented glucagon dependence of hepatic glucose production in cirrhosis of the liver. *J Clin Endocrinol Metab*, 1982. 54(5): p. 961-968.
23. **Krones A, Kietzmann T, and Jungermann K.** Periportal localization of glucagon receptor mRNA in rat liver and regulation of its expression by glucose and oxygen in hepatocyte cultures. *FEBS Lett*, 1998. 421(2): p. 136-40.
24. **Lam TK, Yoshii H, Haber CA, Bogdanovic E, Lam L, Fantus IG, and Giacca A.** Free fatty acid-induced hepatic insulin resistance: a potential role for protein kinase C-delta. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 2002. 283: p. E682-E691.
25. **Lefkowitz RJ.** G protein-coupled receptors. III. New roles for receptor kinases and beta-arrestins in receptor signaling and desensitization. *J Biol Chem*, 1998. 273(30): p. 18677-80.
26. **Lefkowitz RJ, Pitcher J, Krueger K, and Daaka Y.** Mechanisms of beta-adrenergic receptor desensitization and resensitization. *Adv Pharmacol*, 1998. 42: p. 416-20.
27. **Legare A, Drouin R, Milot M, Massicotte D, Peronnet F, Massicotte G, and Lavoie C.** Increased density of glucagon receptors in liver from endurance-trained rats. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 2001. 280(1): p. E193-6.
28. **Lo S, Russell JC, and Taylor AW.** Determination of glycogen in small tissue samples. *J Appl Physiol*, 1970. 28: p. 234-236.
29. **Matas Bonjorn V, Latour MG, Bélanger P, and Lavoie JM.** Influence of prior exercise and liver glycogen content on the sensitivity of the liver to glucagon. *J Appl Physiol*, 2002. 92: p. 188-194.
30. **Orskov L, Alberti KG, Mengel A, Moller N, Pedersen O, Rasmussen O, Seefeldt T, and Schmitz O.** Decreased hepatic glucagon responses in type 1 (insulin-dependent) diabetes mellitus. *Diabetologia*, 1991. 34(7): p. 521-6.
31. **Pitcher JA, Fredericks ZL, Stone WC, Premont RT, Stoffel RH, Koch WJ, and Lefkowitz RJ.** Phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate (PIP₂)-enhanced G protein-coupled receptor kinase (GRK) activity. Location, structure, and regulation of the PIP₂ binding site distinguishes the GRK subfamilies. *J Biol Chem*, 1996. 271(40): p. 24907-13.

32. **Podolin DA, Wills BK, Wood IO, Lopez M, Mazzeo RS, and Roth DA.** Attenuation of age-related declines in glucagon-mediated signal transduction in rat liver by exercise training. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 2001. 281(3): p. E516-23.
33. **Pohl SL.** The glucagon receptor and its relationship to adenylate cyclase. *Fed Proc* 36: 2115-2118, 1977.
34. **Portois L, Maget B, Tastenoy M, Perret J, and Svoboda M.** Identification of a glucose response element in the promoter of the rat glucagon receptor gene. *J Biol Chem*, 1999. 274(12): p. 8181-90.
35. **Premont R, Iyengar R.** Glucagon-induced desensitization of adenylyl cyclase in primary cultures of chick hepatocytes. Evidence for multiple pathways. *J Biol Chem*, 1988. 263(31): p. 16087-95.
36. **Rao RH.** Adaptations in glucose homeostasis during chronic nutritional deprivation in rats: hepatic resistance to both insulin and glucagon. *Metabolism*, 1995. 44(6): p. 817-24.
37. **Samuel VT, Liu Z-X, Qu X, Elder BD, Bilz S, Belfroy D, Romanelli AJ, and Shulman GI.** Mechanism of hepatic insulin resistance in non-alcoholic fatty liver disease. *J Biol Chem*, 2004. 279: p. 32345-32353
38. **Soman V, Felig P.** Regulation of the glucagon receptor by physiological hyperglucagonaemia. *Nature*, 1978. 27;272(5656): p. 829-32.
39. **Santos A, Blasquez E.** Regulatory effect of glucagon on its own receptor concentrations and target-cell sensitivity in the rat. *Diabetologia*, 1982. 22(5):p. 362-71.
40. **Srikant CB, Freeman D, McCorkle K, Unger RH.** Binding and biologic activity of glucagon in liver cell membranes of chronically hyperglucagonemic rats. *J Biol Chem*, 1977. 10;252(21): p. 7434-8.
41. **Strackowski M, Kowalska I, Dzienis-Strackowska S, Kinalski M, Gorski J, and Kinalska I.** The effect of exercise training on glucose tolerance and skeletal muscle triacylglycerol content in rats fed with a high-fat diet. *Diabetes Metab*, 2001. 27(1): p. 19-23.
42. **Svoboda M, Portois L, and Malaisse WJ.** Glucose regulation of the expression of the glucagon receptor gene. *Mol Genet Metab*, 1999. 68(2): p. 258-67.

43. **Valiquette M, Bonin H, Hnatowich M, Caron MG, Lefkowitz RJ, Bouvier M.** Involvement of tyrosine residues located in the carboxyl tail of the human beta 2-adrenergic receptor in agonist-induced down-regulation of the receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1990, 87(13): p. 5089-93.
 44. **Van Ermen A, Fraeyman N.** Desensitization of alpha 1-, beta- and glucagon receptors in rat hepatocytes: influence of ageing. *Mech Ageing Dev*, 1994.75(1): p.45-58.
 45. **Watanabe M, Hayasaki H, Tamayama T, Shimada M.** Histologic distribution of insulin and glucagon receptors. *Braz J Med Biol Res*, 1998. 31(2): p. 243-56.
Review.
-

LEGENDS

Fig. 1. Plasma glucose, insulin, glucagon concentrations and insulin to glucagon ratio in resting (Rest) and exercised (Ex) rats after two weeks of a standard (SD) or a high-fat (HF) diet. Values are means \pm SE with $n = 8-10$ rats/group. ^aSignificantly different between rest and Ac-Ex groups, $P < 0.05$. ^cSignificantly different between the SD and HF fed groups, $P < 0.05$

Fig. 2. Hepatic triglyceride and glycogen concentrations and plasma free fatty acid levels in resting (Rest) and exercised (Ex) rats after two weeks of a standard (SD) or a high-fat (HF) diet. Values are means \pm SE with $n = 8-10$ rats/group. ^aSignificantly different between rest and Ac-Ex groups, $P < 0.05$. ^cSignificantly different between the SD and HF fed groups, $P < 0.05$

Fig. 3. Total cellular and plasma membrane glucagon receptor in resting (Rest) and exercised (Ex) rats after two weeks of a standard (SD) or a high-fat (HF) diet. Values are means \pm SE with $n = 8-10$ rats/group. For total cellular GR, values are means \pm SE with $n = 8-10$ rats/group and 10 cells/rats. ^aSignificantly different between rest and Ac-Ex groups, $P < 0.05$. ^cSignificantly different between the SD and HF fed groups, $P < 0.05$

Fig. 4. Endosomal and lysosomal glucagon receptor in resting (Rest) and acutely exercised (Ac-Ex) rats after two weeks of a standard (SD) or a high-fat (HF) diet. Values are means \pm SE with $n = 8-10$ rats/group. ^aSignificantly different between rest and Ac-Ex groups, $P < 0.05$. ^cSignificantly different between the SD and HF fed groups, $P < 0.05$

Fig. 5. Total cellular glucagon receptor content. Immunofluorescence microscopy of isolated hepatocytes with the glucagon receptor antibody ST-18 as the primary antibody. An Alexa Fluor 633 dye was used as the secondary antibody. For each primary antibody, permeabilized cells (+) are compared with nonpermeabilized cells (-). The epitopes of ST-18 antibody is intracellular. $n = 10$ rats/groups - 10 cells/rats

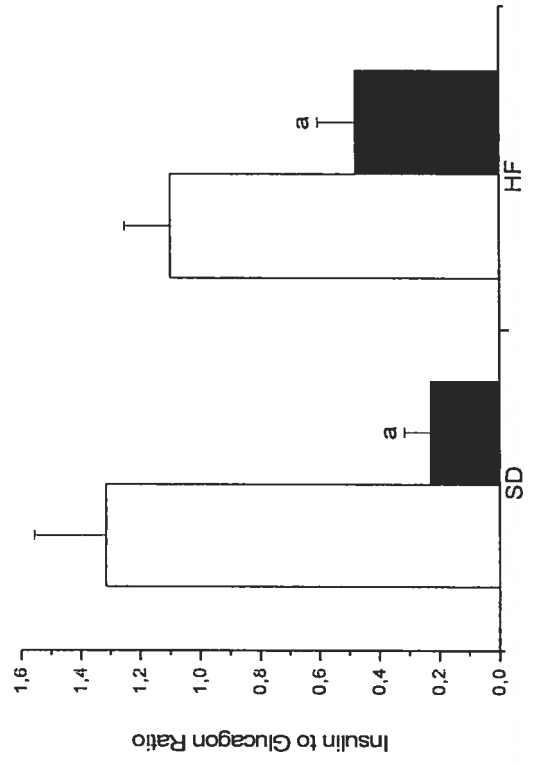
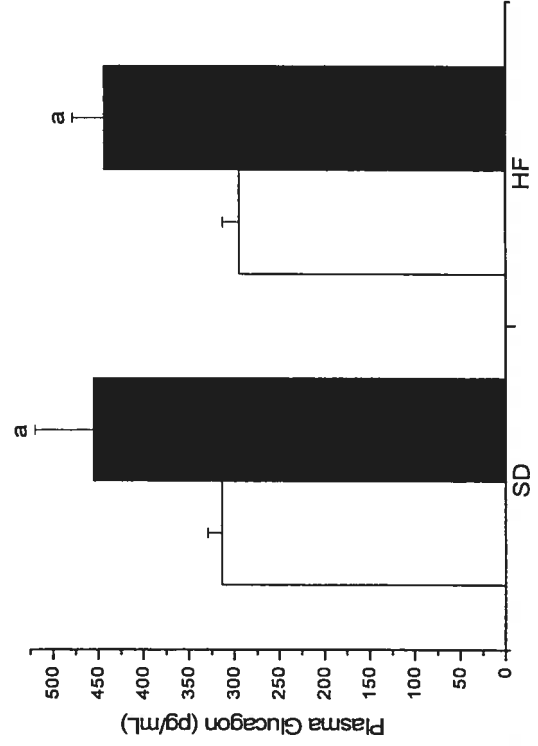
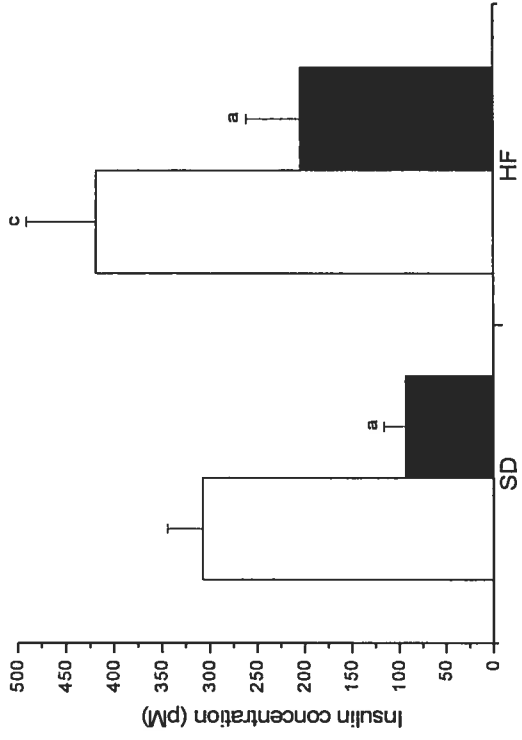
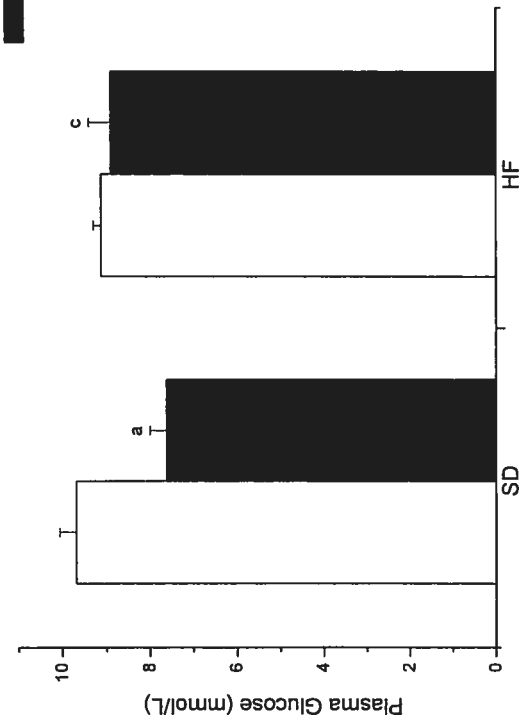
Table 1. Body weight (BW) measured at day 1 and 14 of the experimental period and relative liver weight measured at the end of the experiment.

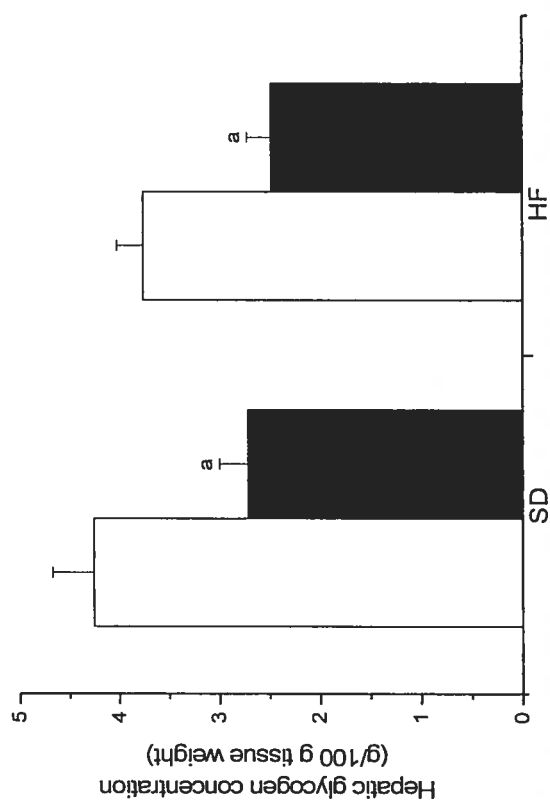
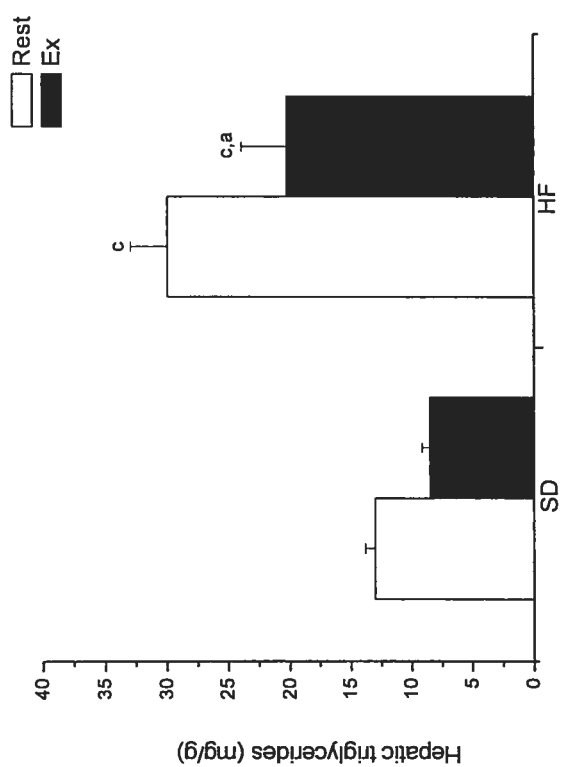
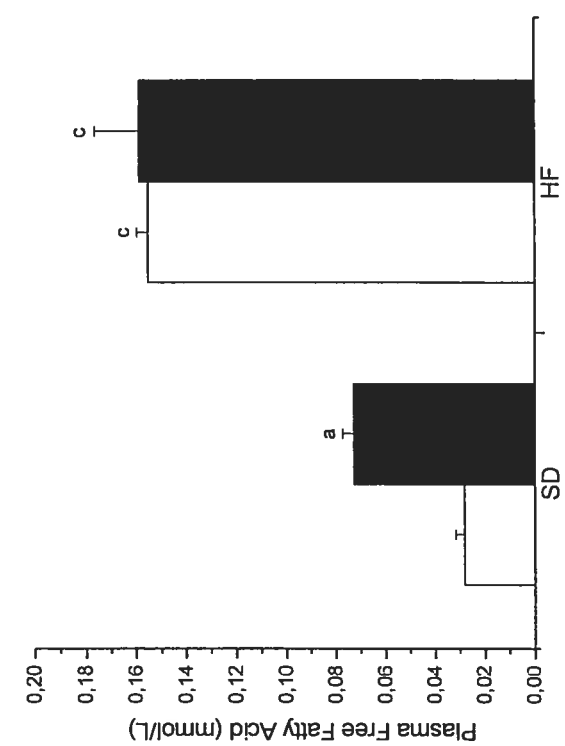
Groups	Weight upon arrival (g)	Weight at day 14 (g)	Liver weight (g/kg BW)
SD-Rest	208.6 ± 2.3	335.9 ± 5.1	37.7 ± 0.9
SD-Ex	209.3 ± 1.3	320.3 ± 6.1	32.6 ± 1.3
HF-Rest	208.4 ± 5.6	326 ± 6.8	36.7 ± 1.6
HF-Ex	208.7 ± 3.0	315 ± 4.5	30.5 ± 3.4

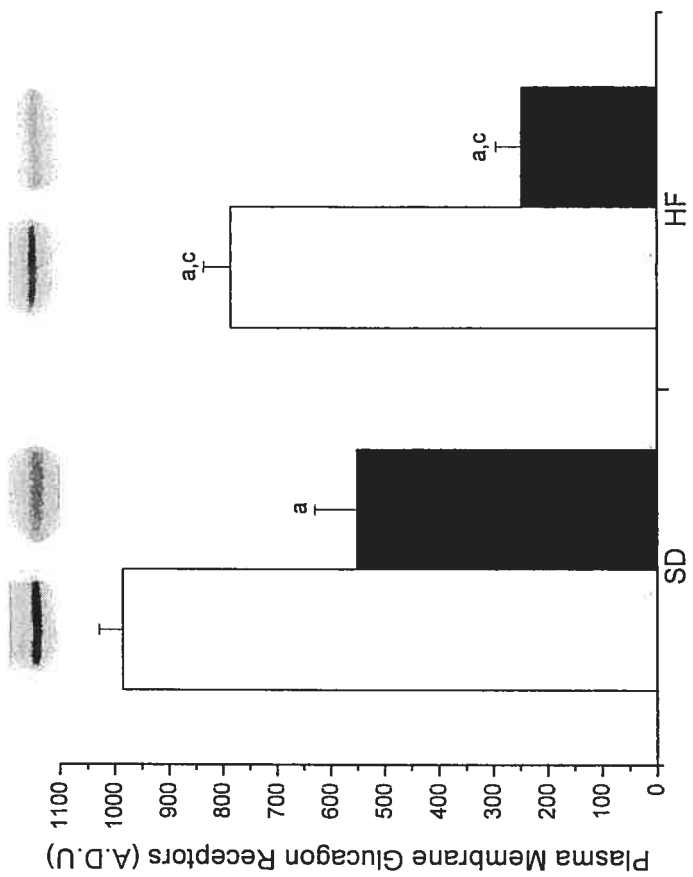
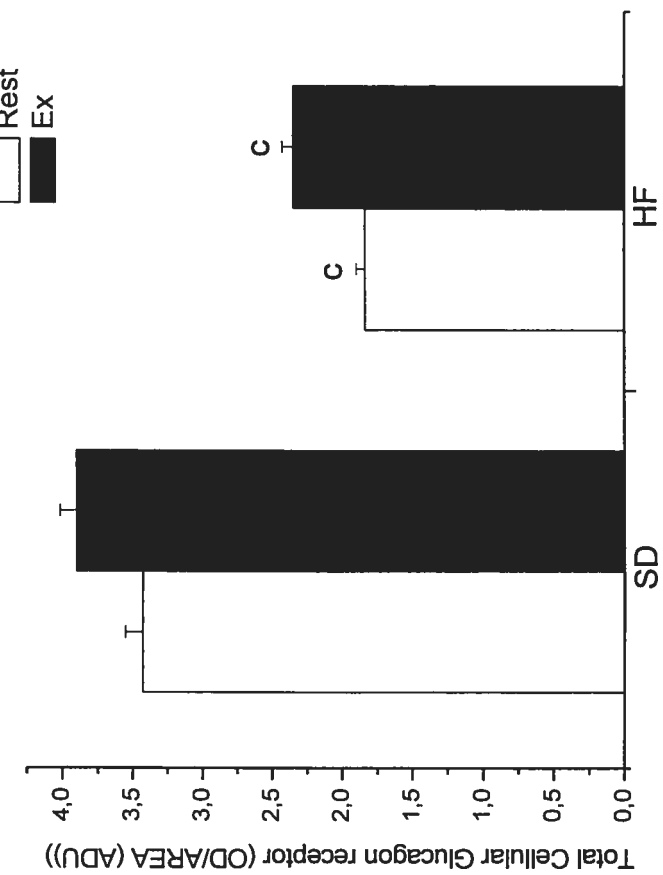
Values are reported as means ± SE (n = 8 – 10 rats/group). SD-Rest: standard diet-rest; SD-Ex: standard diet-acute exercise; HF-Rest: high-fat diet-rest; HF-Ex: high-fat diet-acute exercise.

FIGURES
MANUSCRIT 3

Rest
Ex



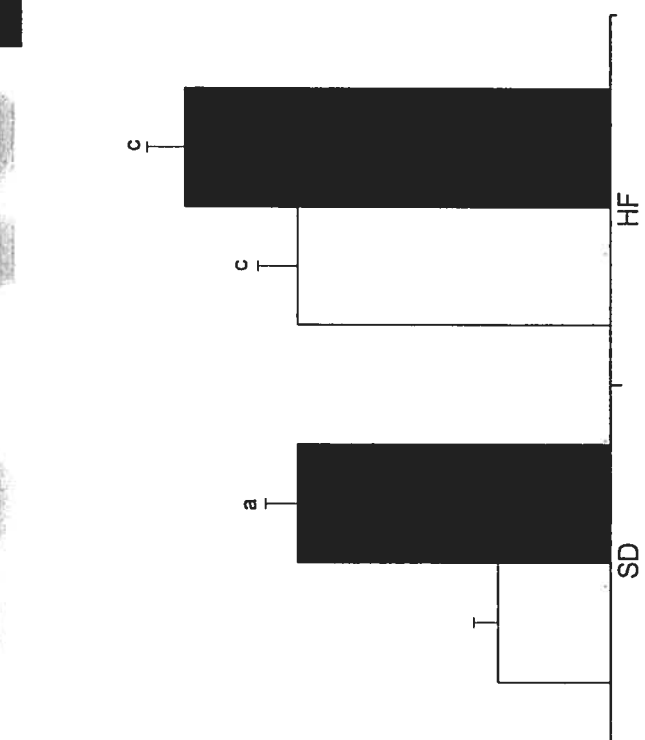




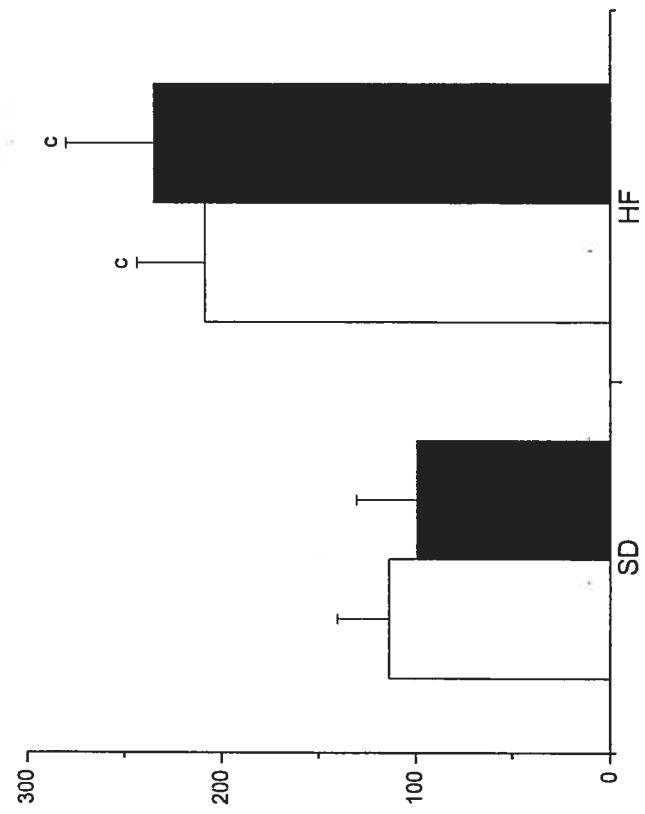
Rest
Ex



Endosomal Glucagon Receptors (A.D.U)



Lysosomal Glucagon Receptors (A.D.U)



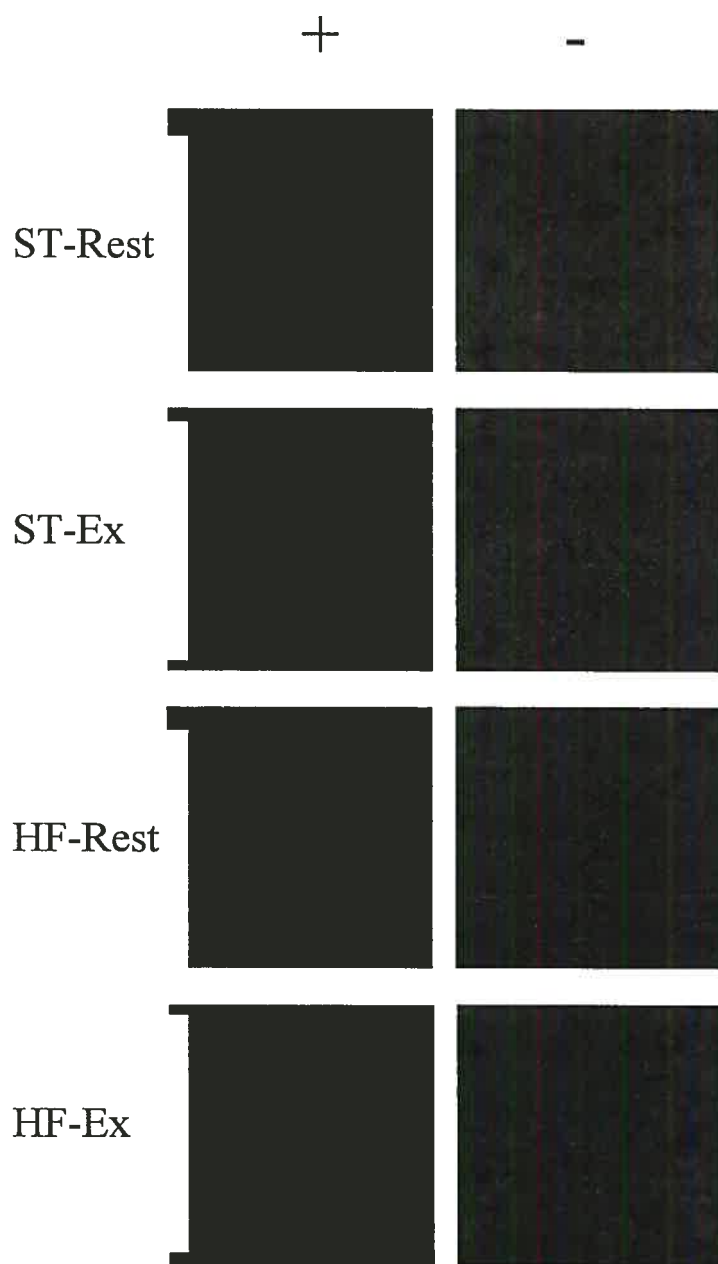


FIG. 5. Total cellular glucagon receptor content. Immunofluorescence microscopy of isolated hepatocytes with the glucagon receptor antibody ST-18 as the primary antibody. An Alexa Fluor 633 dye was used as the secondary antibody. For each primary antibody, permeabilized cells (+) are compared with nonpermeabilized cells (-). The epitopes of ST-18 antibody is intracellular. n = 10 rats/groups - 10 cells/rats

Chapitre 6

DISCUSSION DE LA THÈSE

6. DISCUSSION

Bien que de nombreuses publications scientifiques traitent du rôle de la SHNA dans le développement de la résistance hépatique à l'insuline, aucune étude n'a vérifié le rôle de cette pathologie sur le métabolisme hépatique du glucagon. Les résultats des études présentées dans le cadre de cette thèse indiquent que l'infiltration hépatique de triglycérides diminue la sensibilité du foie au glucagon.

La première étude de cette thèse nous a permis d'observer une résistance hépatique au glucagon lors d'une SHNA. Il est clairement montré que cette baisse de sensibilité au glucagon est en partie causée par l'augmentation de triglycérides hépatiques. La seconde et troisième étude nous permettent de cerner les adaptations cellulaires pouvant potentiellement expliquer la résistance hépatique au glucagon lors d'une SHNA. Ayant déjà été élaborés dans les articles inclus dans cette thèse, les principaux thèmes de discussion ne seront pas répétés dans la présente section. Cependant, certaines hypothèses, spéculations et considérations qui n'ont pas été mentionnées dans les articles seront abordées.

6.1. Discussion et considérations de la première étude

Lors de la première étude, nous avons évalué la PHG induite par un clamp hyperglucagonémique (2 μ g/kg/min) chez des rats soumis à des conditions alimentaires (diètes standard (SD) ou riche en lipides (HF)) et d'activité (sédentaire ou entraînement) différentes. Les résultats expérimentaux indiquent que la PHG des rats sédentaires soumis à une diète HF est significativement inférieure à celle des rats soumis à une diète SD. L'entraînement en endurance permet de rétablir partiellement la PHG des rats soumis à une diète HF à des taux similaires de celle des rats sédentaires nourris à une diète SD.

6.1.1. Production hépatique de glucose

La PHG est le résultat de la dégradation du glycogène (glycogénolyse) et de la synthèse de nouveau glucose en provenance du lactate, d'acides aminés et de

glycérol (gluconéogenèse). Le niveau d'activation de la gluconéogenèse est régulé par les enzymes phosphoenolpyruvate carboxykinase (PEPCK), fructose-1,6-bisphosphatase (FBPase) et glucose-6-phosphatase (G-6-Pase) (Figure 8). En situation asymptomatique, l'insuline a la capacité d'inhiber la gluconéogenèse en diminuant l'activité de ces trois enzymes (157, 158, 159). Donc, en situation post-prandiale, quand la concentration d'insuline est à son paroxysme, la gluconéogenèse est presque totalement inhibée.

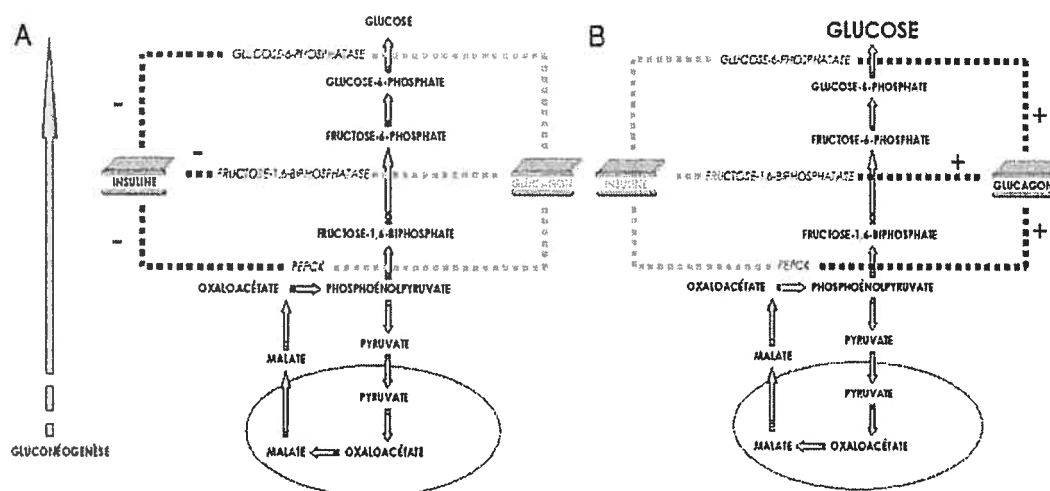


Figure 8 : Contrôle de la gluconéogenèse par l'insuline et le glucagon. A : rôle de l'insuline dans la gluconéogenèse post-prandiale; B : rôle du glucagon dans la gluconéogenèse à jeun.

Par contre, lors de pathologies telles que la résistance à l'insuline, la SHNA et le diabète de type 2, la gluconéogenèse post-prandiale augmente (26, 95, 134, 194). Certaines études montrent que lors de ces conditions, les lipides circulants et hépatiques sont responsables de la perte de l'action inhibitrice de l'insuline sur les enzymes gluconéogéniques (84, 95, 134, 194). Cette modification de l'action de l'insuline entraîne une augmentation significative de la production hépatique de glucose en situation post-prandiale.

Il se peut que le développement d'une résistance hépatique au glucagon lors des premières semaines d'un traitement à une diète riche en lipides ait un rôle inhibiteur sur la sur-production de glucose en provenance de la gluconéogenèse. Comme nous l'avons décrit à la section 1.3.2, le glucagon augmente l'expression et

l'activité de la phosphoenolpyruvate carboxykinase (PEPCK), fructose-1,6-bisphosphatase (FBPase) et glucose-6-phosphatase (G-6-Pase). Il est fort probable qu'une résistance hépatique au glucagon se développe en réaction à la perte d'inhibition de l'insuline sur ces enzymes. En effet, la perte de sensibilité du foie au glucagon a pour effet de minimiser l'effet stimulateur de cette hormone sur les enzymes clés de la gluconéogenèse. Il en résulte une diminution de la production hépatique de glucose en provenance de la gluconéogenèse en réponse à une hyperglucagonémie. Cette perte de stimulation du glucagon sur la G-6-Pase affecte également la glycogénolyse : après la conversion du glucose-1 phosphate en glucose-6-phosphate, la G-6-Pase libère le glucose provenant du glycogène hépatique dans la circulation sanguine. Ainsi, en plus d'inhiber la gluconéogenèse, la résistance hépatique au glucagon peut réduire l'efficacité de la glycogénolyse en diminuant l'activité enzymatique de la G-6-Pase.

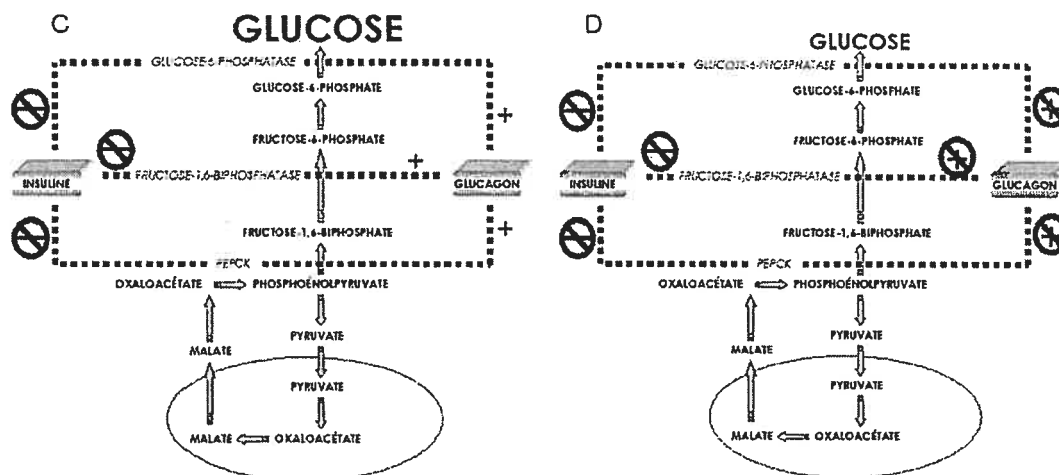


Figure 9 : Contrôle de la gluconéogenèse par l'insuline et le glucagon. C : perte d'inhibition de l'insuline lors d'une pathologie; D; rôle hypothétique de la résistance au glucagon pour rétablir la gluconéogenèse

Des modifications dans la sensibilité du foie au glucagon ont été observées lors de différentes conditions symptomatiques chroniques (26, 155, 169). Lors de ces pathologies, la perte de sensibilité du glucagon est uniquement observée sur la glycogénolyse. La diminution de la stimulation de glycogénolyse par le glucagon est accompagnée d'une augmentation de la gluconéogenèse sans changements dans la production hépatique de glucose. Par contre, nous croyons que les adaptations métaboliques observées lors de ces études sont le fruit d'une adaptation chronique à

la présence de lipides hépatiques. Aucune étude, à notre connaissance, n'a tenté de vérifier les adaptations à court terme de la présence de lipides hépatiques sur la gluconéogenèse et la glycogénolyse. Il est fort possible que dans les premières semaines du développement d'une SHNA induite par une diète riche en lipides, la sensibilité de la gluconéogenèse ainsi que celle de glycogénolyse au glucagon peuvent être altérées. Dans notre première étude, l'observation d'une plus faible production hépatique de glucose dans le groupe HF-Sed par rapport au groupe SD-Sed, malgré un taux de dégradation du glycogène hépatique semblable, suggère une défectuosité dans la réponse de la gluconéogenèse au glucagon. De plus amples études sont nécessaires pour élucider les adaptations de la gluconéogenèse et de la glycogénolyse à une diète riche en lipides de huit semaines.

Si nous acceptons l'hypothèse que la résistance hépatique au glucagon se développe en réponse à la perte d'inhibition de l'insuline sur les enzymes de la gluconéogenèse et de la glycogénolyse, il faut également considérer que cette résistance hépatique au glucagon peut contribuer à la pathogenèse de la SHNA. Une diminution de l'activité de la G-6-Pase a pour conséquence d'accumuler du glucose-6-phosphate pour ensuite le diriger dans le cycle des pentoses. Cette voie métabolique est responsable, entre autres, de la conversion du glucose en triglycérides. Il est probable qu'en plus de diminuer la production hépatique de glucose, la résistance hépatique au glucagon contribue au développement de la SHNA en favorisant la synthèse de triglycérides dans les hépatocytes.

Il a déjà été suggéré que l'entraînement en endurance est un inhibiteur de la production hépatique de glucose chez les personnes obèses (51). Cette affirmation est basée sur l'observation que l'entraînement physique en endurance améliore la sensibilité hépatique à l'insuline. En augmentant cette sensibilité, l'entraînement physique améliore le rôle inhibiteur de l'insuline sur les enzymes clés de la gluconéogenèse. Cette observation a été validée à maintes reprises au cours des vingt dernières années (52, 54, 78, 186). Or, dans la présente étude, il est justifié de penser que la résistance hépatique au glucagon induite par une diète riche en lipides peut être partiellement renversée par l'entraînement physique en endurance. De récentes études montrent que l'entraînement et l'exercice physique en endurance ont

la capacité d'augmenter la sensibilité du foie au glucagon (61, 62, 117, 129, 171). L'augmentation de la production hépatique de glucose du groupe HF-Tr en réponse à un clamp hyperglucagonémique suggère que l'entraînement en endurance diminue l'inhibition exercée sur les enzymes de la gluconéogenèse. Nous croyons que la diminution de l'expression et de l'activité des enzymes clés de la gluconéogenèse résultant du développement d'une résistance hépatique au glucagon peuvent être évitées grâce à un entraînement physique en endurance. Par contre, nous ignorons comment l'entraînement améliore la production hépatique de glucose induite par un clamp hyperglucagonémique chez des rats soumis à une diète riche en lipides. Bien que plusieurs avenues d'interprétation nous sont offertes, de plus amples études sont nécessaires pour élucider ces résultats.

En résumé, nous croyons que la résistance hépatique au glucagon observée lors de notre première étude se veut un phénomène protecteur voire en réaction à une perte de l'action inhibitrice de l'insuline sur les enzymes clés de la gluconéogenèse. Toutefois, nous ne croyons pas que cette résistance hormonale persiste à long terme sur la production hépatique. L'utilisation d'antagoniste au glucagon et à son récepteur hépatique dans le traitement du diabète de type 2 (130) nous pousse à croire que la résistance hépatique au glucagon est bénéfique dans les premiers instants du développement de la résistance hépatique à l'insuline et du diabète de type 2 induit par une diète riche en lipides. L'ensemble de la littérature confère à l'entraînement physique en endurance un rôle important dans l'augmentation de la sensibilité tissulaire à l'insuline. Dans la présente étude, nous confirmons les résultats d'études antérieures voulant que l'entraînement et l'exercice en endurance améliorent la sensibilité hépatique au glucagon (61, 62, 117, 129) en plus d'étendre ces observations à la SHNA.

En ce qui a trait aux mécanismes responsables du développement de la résistance hépatique au glucagon et de la perte d'action du glucagon sur les hépatocytes et les métabolismes intermédiaires, nous référons le lecteur aux sections 6.2 et 6.3.

6.2. Discussion et considérations de la deuxième et troisième étude

6.2.1. Résultats de la seconde étude

Pour tenter d'expliquer la baisse d'efficacité du glucagon observée lors de notre première étude, nous avons décidé de vérifier si les paramètres membranaires responsables de l'initiation de la cascade de signalisation intracellulaire du glucagon sont modifiés par les triglycérides hépatiques. Précédemment, une étude de Gauthier et al. (74) sur la cinétique du développement de la SHNA à une diète riche en lipides révèle une accumulation maximale de triglycérides hépatiques après deux semaines de traitement alimentaire. Nous avons donc opté pour deux semaines de traitement alimentaire à une diète riche en lipides afin de voir si une quantité maximale de triglycérides hépatiques peut modifier les paramètres membranaires responsables de l'initiation de la cascade de signalisation intracellulaire du glucagon. Nous avons donc mesuré la densité (nombre) et l'affinité des récepteurs hépatiques membranaires au glucagon en plus de vérifier le contenu protéique en protéines G stimulantes ($G_{s\alpha}$) et inhibitrices ($G_{i\alpha 2}$). Nous avons observé une diminution du nombre de RG, du contenu membranaires en protéines $G_{s\alpha}$, du ratio Gs/Gi ratio en plus d'observer une relation causale entre les triglycérides hépatiques et la diminution du nombre de récepteurs membranaires au glucagon. Les modifications dans les paramètres membranaires responsables de l'initiation de la cascade de signalisation intracellulaire du glucagon peuvent ainsi expliquer la résistance hépatique au glucagon observée lors de notre première étude.

6.2.2. Modification du contenu membranaire en protéines $G_{s\alpha}$ et $G_{i\alpha 2}$ et son impact sur l'homéostasie glucidique

Des modifications dans le contenu membranaire en protéines $G_{s\alpha}$ ont précédemment été observées dans diverses lignées cellulaires (133, 207), dans des animaux génétiquement modifiés (*ob/ob*, *fa/fa*, *db/db*) et chez des humains et animaux souffrant de physiopathologies comme l'obésité et le diabète de type 2 (13, 14, 32, 76, 211). Plusieurs auteurs avancent l'hypothèse que ces modifications sont

influencées par diverses hormones (127). Au niveau hépatique et adipocytaire, il est suggéré que l'insuline peut réguler le contenu tissulaire en protéines $G_{s\alpha}$ (93, 144). Par contre, peu d'études ont, à ce jour, tenté de vérifier le rôle de l'insuline sur la régulation des protéines $G_{s\alpha}$.

Les hormones thyroïdiennes et les glucocorticoïdes ont la capacité d'altérer la réponse cellulaire aux catécholamines, à l'insuline et au glucagon (123). Ces hormones influencent également l'expression des protéines G dans nombreux tissus. En effet, une augmentation des hormones thyroïdiennes et des glucocorticoïdes diminue l'expression des sous-unités α et β des protéines $G_{s\alpha}$ et G_i ainsi que la quantité de récepteurs β -adrénergiques et l'unité catalytique de l'adénylate cyclase dans diverses cellules (127). Chez la souris ob/ob et dans l'obésité humaine, on observe à la fois une diminution des protéines $G_{s\alpha}$ (13, 32) et une augmentation drastique des concentrations plasmatiques d'insuline, de glucocorticoïdes et des hormones thyroïdiennes. Parce que la transcription (ARNm) des protéines $G_{s\alpha}$ est normale chez les souris ob/ob et dans les modèles d'obésité humaine et animale, il est suggéré, mais non prouvé, que ces augmentations hormonales diminuent la traduction des protéines $G_{s\alpha}$ dans les différents modèles expérimentaux (123). Dans notre seconde étude, la diminution du contenu en protéines $G_{s\alpha}$ ne peut être le résultat d'une augmentation des concentrations plasmatiques d'insuline : les concentrations d'insuline dans les groupes SD et HF sont similaires malgré une plus grande réduction du contenu en protéines $G_{s\alpha}$ dans le groupe HF. Puisque nous n'avons pas mesuré les concentrations plasmatiques des glucocorticoïdes et des hormones thyroïdiennes, nous ignorons si ces derniers jouent un rôle dans la diminution des protéines $G_{s\alpha}$ dans notre modèle de SHNA. Toutefois, nous savons que les effets délétères des glucocorticoïdes et des hormones thyroïdiennes sur les protéines $G_{s\alpha}$ se développent uniquement si les concentrations plasmatiques d'insuline sont élevées (24). Dans la présente étude, nous croyons qu'il est improbable que les glucocorticoïdes et les hormones thyroïdiennes soient

responsables de la diminution en protéines $G_{s\alpha}$: les concentrations plasmatiques d'insuline sont trop basses pour potentialiser les effets de ces deux hormones.

Il est difficile de conférer une fonctionnalité métabolique à une diminution des protéines $G_{s\alpha}$. Peu importe le mécanisme responsable de la diminution du contenu en protéines $G_{s\alpha}$ dans les adipocytes et les hépatocytes, il semble qu'une modification du contenu protéique en $G_{s\alpha}$ ne diminue pas la stimulation de l'adénylate cyclase par les catécholamines et le glucagon chez les souris *ob/ob* ou dans un modèle animal d'induction de l'obésité par une diète riche en lipides (14, 123). En effet, une diminution de 50% de la concentration membranaire des protéines $G_{s\alpha}$ n'entraîne aucune baisse de l'activation de l'adénylate cyclase (65, 123). Il est observé que de fortes concentrations d'adénylate cyclase sont atteignables malgré une diminution significative dans le contenu membranaire en protéines $G_{s\alpha}$ (34). Ainsi, il est possible que la diminution observée dans la production hépatique de glucose induite par le glucagon dans diverses pathologies (26, 155, 169) et dans notre modèle de SHNA ne soit pas le résultat d'un changement dans les concentrations membranaires des protéines $G_{s\alpha}$ hépatiques.

Il existe très peu d'informations dans la littérature concernant des modifications « naturelles » de l'expression et de l'activité de la protéine $G_{i\alpha 2}$ lors de physiopathologies comme le diabète de type 2 et la SHNA. Les seules informations pertinentes de cette protéine lors de ces physiopathologies proviennent d'études sur des animaux mutants (*db/db* et *ob/ob*) et transgéniques (13, 14, 76, 220). Les souris *db/db* et *ob/ob* montrent une diminution de l'expression des protéines $G_{i\alpha 2}$ tandis qu'une souris transgénique sous-exprimant la protéine $G_{i\alpha 2}$ hépatique est utilisée en tant que modèle d'étude de la résistance à l'insuline. Une déficience en protéine $G_{i\alpha 2}$ semble augmenter l'activité des protéines-tyrosines phosphatases et diminuer la phosphorylation des IRS-1 par l'insuline. Une fois de

plus, il faut insister sur le fait que ces modifications proviennent de mutation et de manipulation génique. Leur pertinence est discutable lorsqu'on les compare à nos résultats. Bien que nos résultats divergent de ces derniers, une augmentation du contenu protéique en $G_{i\alpha 2}$ dans notre modèle de SHNA est compatible avec les résultats observés lors de notre première étude : une augmentation des $G_{i\alpha 2}$ aurait comme conséquence de limiter l'activation de l'adénylate cyclase, de l'AMPc et de la PKA suite à une stimulation au glucagon. Faisant ainsi, une diminution de la production hépatique de glucose sent suit. Par contre, nous ne savons pas encore quels sont les éléments (circulants ou tissulaires) de la diète riche en lipides qui provoquent l'augmentation des protéines $G_{i\alpha 2}$.

L'interprétation des résultats de notre seconde étude et des études antérieures sur les protéines $G_{s\alpha}$ et $G_{i\alpha 2}$ requiert une attention méthodologique. En effet, la quantification du contenu cellulaire en ARNm et en protéines de la $G_{s\alpha}$ et $G_{i\alpha 2}$ se fait presque exclusivement sur des préparations membranaires d'hépatocytes. Il est suggéré, mais non prouvé, que certaines protéines G ne sont pas exclusivement membranaires, mais également cytosoliques (133). Si tel est le cas, une toute autre avenue d'interprétation des résultats s'imposerait. Par contre, nous préférons ne pas aborder ce sujet de discussion dans la présente thèse.

On accepte depuis longtemps que les mécanismes cellulaires responsables de l'activation de la voie de signalisation des protéines G sont linéaires : la stimulation d'un récepteur par son agoniste mène à la dissociation du sous-unité α du dimère $\beta\gamma$ et l'activation d'effecteurs en aval. Cependant, la découverte récente d'une famille de protéines RGS (*regulators of G protein signaling*) vient complexifier les notions jusqu'à maintenant acquises dans la signalisation cellulaire médiée par les protéines G (54). Les RGS ont pour fonction d'accélérer l'activité intrinsèque de la GTPase (GAP) sur la sous-unité G_{α} et de diminuer la liaison de cette sous-unité sur des effecteurs. Le rôle des RGS est donc de diminuer l'activation de l'adénylate cyclase et la formation subséquente de AMPc (Figure 10) (168).

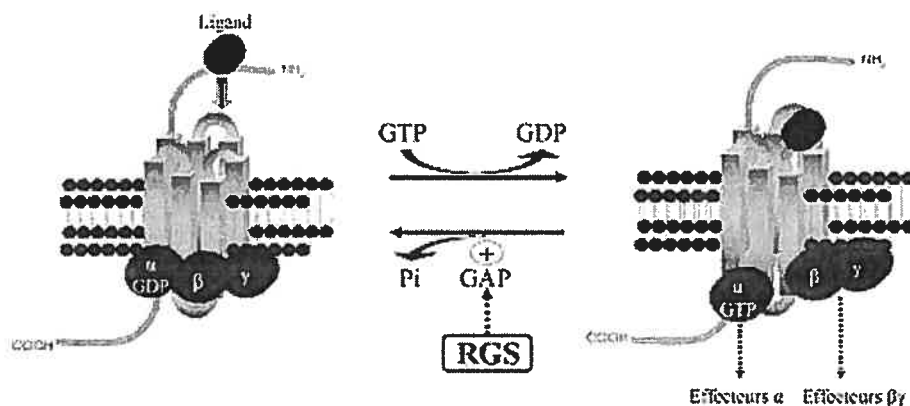


Figure 10 : Rôle de RGS dans l'activation des protéines G dans les récepteurs couplés aux protéines G. GTP : Guanine tri-phosphate; GDP : Guanine di-phosphate; Pi : phosphate inorganique; GAP : *guanosine triphosphatase-activating proteins*; RGS : *Regulators of G-protein signaling*; α , β , γ : sous-unités alpha, beta et gamma de la protéine G hétérotrimérique

Lors de diverses pathologies, il est montré que l'activation de l'adénylate cyclase par un ligand peut être maintenue malgré une diminution significative du contenu membranaire en protéines $G_{s\alpha}$ (26, 34, 65, 123, 169). Il est donc justifié de croire que des modifications dans la production hépatique de glucose lors de notre première étude et lors de ces différentes pathologies (26, 34, 65, 123, 169) sont peut-être le résultat de modifications de l'action des RGS sur la formation/stimulation d'effecteurs en aval au protéines $G_{s\alpha}$. Une diminution de l'expression et de l'activité des RGS a déjà été observée chez des souris C57BL/6J suite à une diète riche en lipides de dix semaines. Pour les auteurs, la perte d'inhibition des RGS dans ce modèle animal spécifique explique l'augmentation de la production hépatique de glucose observée (168). Par contre, il est important de mentionner que la souris C57BL/6J des laboratoires Jackson est un animal susceptible à l'obésité et au diabète de type 2 induits par une diète riche en lipides. Il est fort possible que les effets délétères observés chez la souris C57BL/6J lors d'une diète riche en lipides de dix semaines sont uniques à ce génotype. Toutefois, il se peut que des modifications des RGS peuvent survenir lors d'une diète riche en lipides chez un rats de type Sprague Dawley comme ceux utilisés lors de nos études. À la lumière des ces informations, trois questions s'imposent : 1) Est-ce possible que la diminution du contenu en protéines $G_{s\alpha}$, observée lors de notre seconde étude soit

accompagnée d'une modification de l'expression et l'activité des RGS? 2) Est-ce que des modifications dans l'activité des RGS lors du développement de la SHNA de notre première étude peuvent expliquer la diminution de la production hépatique de glucose induite par le glucagon? 3) Est-ce que l'entraînement et l'exercice physique en endurance modulent l'expression et l'activité des RGS?

En attendant plus d'informations, nous ne pouvons que spéculer sur le rôle régulateur des RGS dans notre modèle d'induction d'une SHNA et de l'impact de l'exercice physique sur ces protéines.

Il est possible que les modifications de la PHG induite par le glucagon observées lors de notre première étude et lors d'études antérieures (26, 155) soient le résultat: 1) D'une défectuosité en amont et/ou en aval de l'adénylate cyclase dans la voie de signalisation PKA-dépendante ou 2) d'une défectuosité dans la liaison du glucagon sur son récepteur et d'une diminution de la disponibilité du récepteur pour le glucagon. Nous discutons du deuxième point lors de la prochaine section.

6.2.3. Résultats de la troisième étude

Suite à l'observation d'une diminution de la production hépatique de glucose en réponse au glucagon lors de notre première étude et d'une diminution du nombre de récepteurs au glucagon (B_{max}) lors de notre seconde étude, nous voulons expliquer davantage la perte de sensibilité des hépatocytes au glucagon observée dans notre modèle de SHNA. À cette fin, nous avons mesuré le contenu hépatique total, membranaire, endosomal et lysosomal en RG pour déterminer si la désensibilisation et l'internalisation des récepteurs au glucagon dans notre modèle de SHNA explique la perte de réponse des hépatocytes au glucagon. L'absence d'effets d'un exercice physique en endurance de 30 minutes lors de la seconde étude nous oblige à étendre cette période à 60 minutes. Après deux semaines de diète HF, une diminution (55%) significative ($P < 0.05$) de la quantité totale de RG ainsi que des récepteurs membranaires (20%) est observée. Parallèlement, une augmentation de la présence de RG dans les fractions endosomales et lysosomales est mesurée chez les animaux nourris avec une diète HF. Les effets de l'exercice aigu sur les récepteurs hépatiques au glucagon sont observés uniquement sur les membranes plasmiques et

la fraction endosomale : une seule séance d'exercice en endurance de 60 minutes diminue significativement le contenu membranaire en RG lors des deux diètes tout en augmentant la présence de glucagon dans la fraction endosomale des rats soumis à une diète SD.

6.2.4. Mécanismes responsables de la désensibilisation et de l'internalisation des récepteurs hépatiques au glucagon observées lors des études 2 et 3

Peu d'études ont tenté d'élucider les effets du diabète de type 2, de l'obésité ou de la SHNA sur les mécanismes inhérents à la désensibilisation et dégradation des récepteurs hépatiques au glucagon. Comme nous le mentionnons dans la section 1.5 et dans les discussions du second et du troisième article, les nombreuses études sur les mécanismes responsables de la désensibilisation et l'internalisation des récepteurs couplés aux protéines G (10, 31, 73, 85, 114, 115, 116, 121, 147, 160, 183) proposent des pistes explicatives à ce phénomène cellulaire. Par contre, comme nous l'indiquons dans les articles 2 et 3, nous ignorons toujours comment la SHNA affecte les protéines et les mécanismes impliqués dans la désensibilisation des RCPG.

De même, il est concevable que des mécanismes cellulaires et moléculaires indépendants à ceux discutés dans les sections 1.5 et dans les articles 2 et 3 soient responsables de la désensibilisation et l'internalisation des RG lors de la SHNA. De récentes études sur le rôle de la cytokine TNF- α ainsi que de la sphingomyélinase dans les maladies lipidiques offrent peut-être une nouvelle avenue d'explication.

Dans la section 1.9, nous discutons des mécanismes responsables de l'apparition de la SHNA. Sans vouloir reprendre cette section, nous ajoutons maintenant quelques éléments d'informations à ceux déjà exposés.

Dans la SHNA, la combinaison de la peroxydation lipidiques et la synthèse de cytokines serait à l'origine des multiples effets délétères observés au niveau hépatique lors de cette pathologie. Par contre, il semble que le TNF- α , qui intervient à un stade précoce du développement de la SHNA, joue un rôle crucial dans le développement de ces effets délétères (153). Divers agents tels que les virus,

l'éthanol et les toxines peuvent stimuler la production hépatique du TNF- α par les cellules de Kupffer. Par la suite, le TNF- α se lie à son récepteur cytoplasmique, exprimé dans les hépatocytes, et conduit à l'activation de plusieurs protéines intracellulaires qui stimulent diverses kinases et protéases (126). Chez les patients atteints de SHNA, on note une surexpression de l'ARN messager du TNF- α dans le foie et les tissus adipeux (48). Comme il est observé dans des modèles animaux (150) ainsi que chez des patients atteints de SHNA (213), l'augmentation du TNF- α peut résulter de l'accumulation de lipides hépatiques ou circulants. Le TNF- α serait également responsable des altérations structurales et fonctionnelles observées dans les mitochondries des hépatocytes de souris génétiquement obèses (ob/ob) et stéatosées (37, 104).

De récentes études montrent que certains domaines des récepteurs au TNF- α peuvent activer divers sphingomyélinases (124, 143, 212) : la sphingomyélinase est l'enzyme responsable de la dégradation des sphingolipides. Ces phospholipides, et en particulier la sphingomyéline et les céramides, sont impliqués dans diverses voies de signalisation cellulaires en plus d'être des phospholipides importants dans l'intégrité des membranes plasmiques de différentes cellules (69, 120). Les sphingolipides fonctionnent également comme second messenger pour une grande variété de stimuli (facteurs de croissance et de différenciation, cytokines inflammatoires [TNF- α , IL, etc.,...], LDL oxydées, etc...). Or, comme nous l'avons mentionné précédemment, le TNF- α se fixe à son récepteur et peut activer diverses sphingomyélinases membranaires : il en résulte une libération de céramides. Ces produits dérivés des sphingomyélinases semblent être les principaux effecteurs intracellulaires du TNF- α . Une variation des concentrations cellulaires de sphingomyéline et de sphingomyélinase peut entraîner des changements dans le métabolisme de la signalisation intracellulaire du glucagon et ainsi expliquer, du moins en partie, les effets délétères observés dans notre modèle de SHNA.

Dans une étude ayant incubé des hépatocytes avec de la sphingomyélinase, une diminution significative de l'activation de l'adénylate cyclase par le glucagon est observée (100). Les auteurs énoncent

l'hypothèse que les sphingomyélinases ont peut-être la capacité de diminuer la présence de récepteurs membranaires au glucagon au niveau des hépatocytes en plus d'augmenter leur dégradation dans les lysosomes. Toutefois, à ce jour, aucune étude n'a tenté de vérifier le rôle de ces enzymes sur la régulation cellulaire et moléculaire des RG.

À la lumière de ces informations, nous croyons qu'il existe des mécanismes « alternatifs » à la désensibilisation des récepteurs hépatiques au glucagon lors d'un SHNA. L'augmentation du TNF- α , observée lors de cette pathologie (37, 67, 104, 150), peut stimuler une variété de récepteurs au TNF entraînant la génération et l'activation de diverses sphingomyélinases et produits dérivés (143, 212). Cette prolifération enzymatique au niveau hépatique peut engendrer une diminution de la sensibilité du foie au glucagon (100) en diminuant la quantité et la présence de RG au niveau hépatique. Par contre, de plus amples études sont nécessaires pour déterminer comment les sphingomyélinases et le TNF- α affectent 1) la désensibilisation des RG, 2) son internalisation, 3) sa synthèse (traduction) et/ou 4) sa transcription (mARN).

6.3. Modèle hypothétique d'induction de la résistance hépatique au glucagon lors d'une stéatose hépatique induite par une diète riche en lipides

En considérant les résultats des études de ce projet doctoral et de l'information disponible dans la littérature, nous proposons un modèle d'induction de la résistance hépatique au glucagon lors d'une SHNA. Bien que ce modèle se veut hypothétique, nous y intégrons les connaissances jusqu'à maintenant acquises dans l'étude du glucagon en plus d'y incorporer des mécanismes d'action que nous jugeons « potentiellement responsables » de la diminution de la sensibilité hépatique au glucagon lors de la SHNA.

L'ensemble de l'information retenue pour l'élaboration de ce modèle a déjà été exposé dans cette thèse. Cependant, pour bien resituer le lecteur dans l'ensemble des informations abordées jusqu'à présent, nous présentons un petit résumé de l'ensemble des connaissances abordé dans le cadre de cette thèse en ce qui à trait au développement de la résistance hépatique au glucagon lors d'une SHNA

1) Informations sur le glucagon, les lipides et l'insuline :

- Rôle du glucagon dans le contrôle de l'expression des enzymes de la gluconéogenèse (Section 1.3.2.)
- Diminution du nombre de récepteurs hépatiques au glucagon dans une physiopathologie comme le diabète, cirrhose, SHNA (Sections 1.5. et 1.9.)
- Diminution du nombre de protéines G dans diverses pathologies lipidiques (Section 1.9.)
- Le rôle et l'impact de l'insuline lors d'une résistance à l'insuline sur la lipolyse, la glycogénolyse et la gluconéogenèse (Section 1.9.)

2) Informations sur le rôle potentiel de diverses voies métaboliques sur la diminution de la sensibilité du foie au glucagon :

- Rôle des lipides hépatiques dans la perte de sensibilité du foie au glucagon (Section 1.9.)
- Rôle des PKC, PKA, AMPc, GRK, Barr dans la désensibilisation et l'internalisation des RCPG (Section 1.5.)

- Le rôle des RGS dans la diminution du couplage des protéines G et l'adénylate cyclase (Section 6.2.2.)
- Lien entre le TNF- α et les sphingomyélinases (Section 6.2.4.)
- Le rôle des sphingomyélinases (Section 6.2.4.)
- Le rôle des triglycérides sur la traduction et la transcription des différentes enzymes du métabolisme du glucagon et de son récepteur (Section 1.9.)

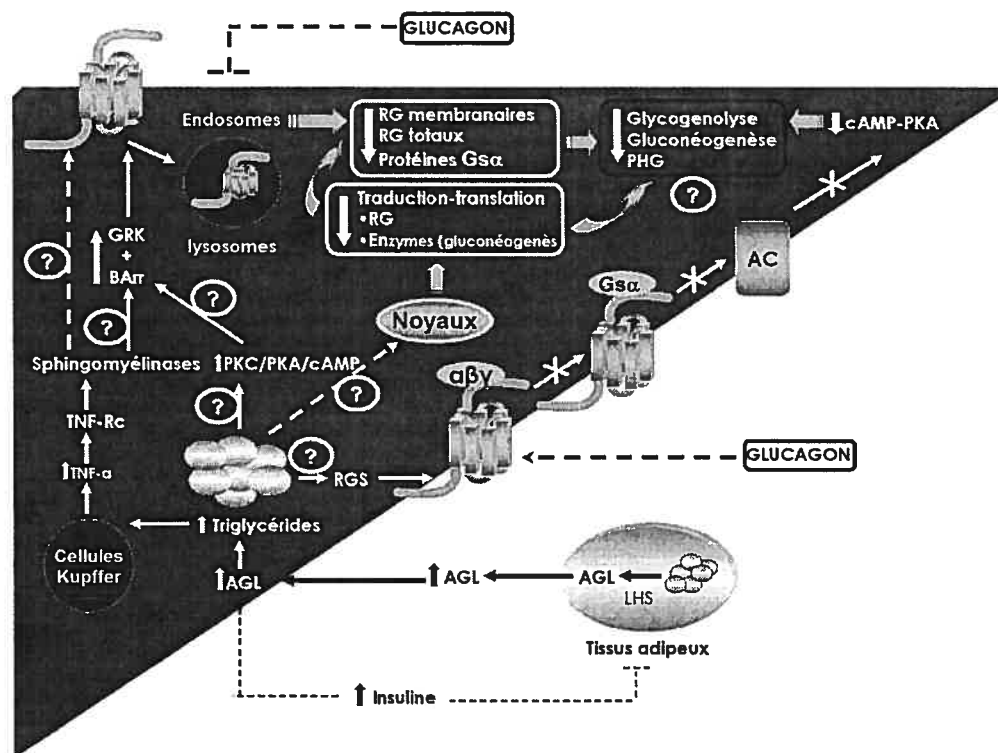


Figure 11 : Modèle hypothétique d'induction de la résistance hépatique au glucagon lors d'une stéatose hépatique induite par une diète riche en lipides. $\alpha\beta\gamma$: Protéine G hétérotrimérique; AC : adénylate cyclase; AGL : Acides gras libres; Barr : Beta Arrestine; AMPc : Adénosine mono phosphate cyclique; G_{α} : Protéine G stimulante; GRK : *G-Protein related kinase* LHS : Lipase hormono-sensible; PHG : Production hépatique de glucose; RGS : *Regulators of G protein signaling*; TNF- α : *Tumor necrosis factor-1*; TNF- α Rc : *Tumor necrosis factor-1 cytosolic receptor*.

L'ingestion d'une diète riche en lipides engendre des effets délétères bien connus. Entre autres, le développement de la résistance à l'insuline provoque nombreuses décompensations cellulaires et moléculaires. Or, nous croyons que le développement de la résistance à l'insuline lors des premières semaines de l'ingestion d'une diète riche en lipides engendre la résistance hépatique au glucagon.

Jumelé à l'absorption de lipides, l'augmentation de la lipolyse adipocytaire, résultant de la résistance à l'insuline, favorise l'estérification hépatique des acides gras libres. En plus d'engendrer la stéatose hépatique non-alcoolique, cette augmentation de triglycérides hépatiques peut activer des voies de signalisation spécifiques : PKC/PKA/AMPC, TNF- α /sphingomyélinase, RGS. Chacune de ces voies de signalisation semble jouer un rôle dans la désensibilisation des RCPG et dans la signalisation cellulaire du glucagon. Ainsi, il se peut qu'une de ces voies (ou une synergie de voies) soit activée lors du développement de la résistance à l'insuline dans un modèle de SHNA. Il en résulterait une diminution de la disponibilité des récepteurs membranaires au glucagon (GRK/Barr, sphingomyélinases), une augmentation de leur dégradation dans les lysosomes (GRK/Barr) et une diminution de la signalisation intracellulaire du glucagon via la protéine $G_{s\alpha}$. Il est également possible que les triglycérides hépatiques affectent directement la transcription des RG et des enzymes de la gluconéogenèse au niveau du noyau nucléaire via des facteurs transcriptionnels quelconques. En considérant ces notions, la production hépatique de glucose serait diminuée lors d'une stimulation au glucagon.

La baisse du nombre de récepteurs au glucagon signifie que le glucagon ne peut plus moduler certaines enzymes hépatiques de la gluconéogenèse et de la glycogénolyse (section 1.5.). Suite à la perte de l'inhibition de l'insuline sur les enzymes de la gluconéogenèse lors des maladies lipidiques (section 1.9.), la PHG augmente. Or, la perte de sensibilité du foie au glucagon peut limiter l'activation des enzymes de la gluconéogenèse par cette hormone et ainsi diminuer la PHG observée lors d'un clamp glucagonémique (section 6.1.1.).

Ce modèle hypothétique du développement de la résistance hépatique au glucagon explique les résultats expérimentaux observés lors des trois projets inclus dans cette thèse. Par contre, comme ce dernier est hypothétique, de plus amples recherches sont nécessaires pour vérifier la véracité de ce modèle.

6.4. L'impact de l'entraînement et de l'exercice physique en endurance sur la résistance hépatique au glucagon

L'entraînement et l'exercice en endurance permettent d'augmenter la sensibilité du foie au glucagon (61, 62, 117, 129). Par contre, à ce jour, aucune étude n'avait étudié le rôle de l'activité physique sur la sensibilité du foie au glucagon lors d'une physiopathologie telle que la SHNA. Les études ayant permis de déceler une amélioration de la sensibilité hépatique au glucagon lors d'un entraînement physique en endurance montrent une augmentation de la quantité de RG (61, 62, 117, Melancon et al., résultats non publiés). Bien que cette augmentation explique la meilleure sensibilité observée, elle ne permet pas de cibler les facteurs inhérents à l'entraînement qui provoque le changement du nombre de RG.

Dans l'optique de la SHNA, déterminer les effets de l'exercice et de l'entraînement physique en endurance sur la sensibilité du foie au glucagon est doublement difficile : est-ce que l'amélioration de la sensibilité hépatique au glucagon lors de la SHNA est due 1) à un effet direct de l'entraînement et de l'exercice sur le récepteur et ses mécanismes de désensibilisation et resensibilisation ou sur 2) l'amélioration des facteurs systémiques (AGL) et intra-hépatiques (TG, sensibilité à l'insuline, etc.).

Certaines études antérieures montrent que la présence d'un protocole d'entraînement physique atténue le gain en adiposité, la détérioration du profil lipidique, le développement de la résistance à l'insuline et la SHNA (15, 74, 75, 106, 140, 172). Dans notre première étude, nous avons montré que l'amélioration de la sensibilité hépatique au glucagon, suite à un entraînement physique en endurance, est le résultat d'une diminution de la concentration des triglycérides hépatiques. Comme nous le mentionnons à la section 1.9., nous croyons que les lipides hépatiques peuvent activer de nombreuses voies de signalisation qui affaiblissent l'efficacité du glucagon au niveau hépatique. Si l'entraînement diminue la quantité de triglycérides hépatiques, il est possible qu'il augmente la sensibilité hépatique du glucagon en diminuant l'activation de ces voies de signalisation.

Est-ce que l'entraînement en endurance peut moduler directement les multiples voies de signalisation mentionnées jusqu'à présent?

Rares sont les études qui ont tenté de vérifier les effets de l'entraînement physique en endurance sur le contenu hépatique en RGS, TNF- α , PKA, PKC, GRK, β Arr. Comme preuve, nous n'avons répertorié aucune étude dans la littérature qui traite des effets de l'exercice et/ou de l'entraînement en endurance sur l'expression, traduction, la transcription et le contenu hépatique des RGS, de la PKA et de la PKC, des sphingomyélinases, des GRK et des β Arr. Il nous est donc impossible de savoir comment l'exercice et/ou l'entraînement affectent ces effecteurs cellulaires. En ce qui a trait au TNF- α , une récente étude n'a montré aucun effet de l'entraînement en endurance sur le contenu hépatique en TNF- α (47).

Conséquemment, nous ignorons toujours comment l'entraînement et/ou l'exercice en endurance peut moduler la sensibilité hépatique au glucagon lors d'une SHNA. Le fait de ne pas avoir répertorié d'études sur le rôle de l'entraînement et de l'exercice en endurance sur les différents effecteurs cellulaires discutés lors de cette thèse nous permet d'envisager plusieurs avenues de recherche dans ce domaine.

RÉFÉRENCES

1. **Abrahamsen N, Lundgren K, and Nishimura E.** Regulation of glucagon receptor mRNA in cultured primary rat hepatocytes by glucose and cAMP. *J Biol Chem.* 270(26): p. 15853-7, 1995.
2. **Ahren B and Larsson H.** Impaired glucose tolerance (IGT) is associated with reduced insulin-induced suppression of glucagon concentrations. *Diabetologia* 44: 1998–2003, 2001.
3. **Authier F, Desbuquois B, De Galle B.** Ligand-mediated internalization of glucagon receptors in intact rat liver. *Endocrinology.* Jul; 131(1):447-57, 1992.
4. **Azzout B, Peret J.** Pyruvate kinase activity in isolated rat hepatocytes during a feeding cycle and during fasting. *Diabete Metab.* 1984 Sep; 10(3):165-70. PMID: 6092162 [PubMed - indexed for MEDLINE]
5. **Azzout B, Peret J.** Development of gluconeogenesis from dihydroxyacetone in rat hepatocytes during a feeding cycle and starvation. *Biochem J.* 1984 Mar 15; 218(3):975-81.
6. **Baggio L, Kim GK, and Drucker DJ** Chronic exposure to GLP-1R agonists promotes homologous GLP-1 receptor desensitization in vitro but does not attenuate GLP-1R-dependent glucose homeostasis in vivo. *Diabetes.* Dec; 53 Suppl 3:S205-14, 2004.
7. **Balage M, Sornet C, Manin M, Grizard J.** Insulin receptor binding and tyrosine kinase activity in liver and skeletal muscle from fasted rats. *Reprod Nutr Dev.* 1989; 29(6):685-7.
8. **Balage M, Grizard J, Sornet C, Simon J, Dardevet D, Manin M.** Insulin binding and receptor tyrosine kinase activity in rat liver and skeletal muscle: effect of starvation. *Metabolism.* 1990 Apr; 39(4):366-73.

9. **Band, G, and Jones CT.** Activation by glucagon of glucose 6-phosphatase activity in the liver of the foetal guinea pig. *Biochem Soc Trans* 8: 586-587, 1980.
10. **Barak LS, Tiberi M, Freedman NJ, Kwatra MM, Lefkowitz RJ, Caron MG.** A highly conserved tyrosine residue in G-protein-coupled receptors is required for agonist-mediated b2-adrenergic receptor sequestration. *J Biol Chem* 269:2790-2795, 1994.
11. **Basu A, Alzaid A, Dinneen S, Caumo A, Cobelli C, and Rizza RA.** Effects of a change in the pattern of insulin delivery on carbohydrate tolerance in diabetic and nondiabetic humans in the presence of differing degrees of insulin resistance. *J Clin Invest* 97: 2351-2361, 1996.
12. **Beale, E, Andreone T, Koch S, Granner M, and Granner D.** Insulin and glucagon regulate cytosolic phosphoenolpyruvate carboxykinase (GTP) mRNA in rat liver. *Diabetes* 33: 328-332, 1984.
13. **Begin-Heick N.** Liver beta-adrenergic receptors, G proteins, and adenylyl cyclase activity in obesity-diabetes syndromes. *Am J Physiol.* Jun; 266(6 Pt 1):C1664-72, 1994.
14. **Begin-Heick N, Welsh J.** The regulation of adenylate cyclase in liver membranes of lean and obese mice. *Mol Cell Endocrinol.* Oct; 59(3):187-94, 1988
15. **Bell RR, Spencer MJ, Sherriff JL.** Voluntary exercise and monounsaturated canola oil reduce fat gain in mice fed diets high in fat. *J Nutr*; 127: 2006-2010, 1997.
16. **Beuers, U, and Jungermann K.** Relative contribution of glycogenolysis and gluconeogenesis to basal, glucagon- and nerve stimulation-dependent glucose output in the perfused liver from fed and fasted rats. *Biochem Int* 21: 405-415, 1990.

- 17. Bhathena SJ, Voyles NR, Smith S, and Recant L.** Decreased glucagon receptors in diabetic rat hepatocytes. Evidence for regulation of glucagon receptors by hyperglucagonemia. *J Clin Invest.* 61(6): p. 1488-97, 1978.
- 18. Birnbaumer L, Pohl SL, Rodbell M, and Sundby F.** The glucagon-sensitive adenylate cyclase system in plasma membranes of rat liver. VII. Hormonal stimulation: reversibility and dependence on concentration of free hormone. *J Biol Chem* 247: 2038–2043, 1972.
- 19. Bloom SR, Johnson RH, Park DM, Rennie MJ, Sulaiman WR.** Differences in the metabolic and hormonal response to exercise between racing cyclists and untrained individuals. *J Physiol.* Jun; 258(1):1-18, 1976.
- 20. Bohm SK, Khitin LM, Smeekens SP, Grady EF, Payan DG, Bunnnett NW.** Identification of potential tyrosine-containing endocytic motifs in the carboxyl-tail and seventh transmembrane domain of the neurokinin 1 receptor. *J Biol Chem.* Jan 24; 272 (4):2363-72, 1997.
- 21. Bonjorn VM, Latour MG, Belanger P, Lavoie JM.** Influence of prior exercise and liver glycogen content on the sensitivity of the liver to glucagon. *J Appl Physiol.* Jan; 92(1):188-94, 2002.
- 22. Bouvier M, Nantel F, Valiquette M, Moffett S, Mouillac B.** Le récepteur β_2 adrénergique. Un modèle d'étude des mécanismes moléculaires de la désensibilisation. *Med Sci; 11* : 819-27, 1995.
- 23. Brand, CL, Rolin B, Jorgensen PN, Svendsen I, Kristensen JS, and Holst JJ.** Immunoneutralization of endogenous glucagon with monoclonal glucagon antibody normalizes hyperglycaemia in moderately streptozotocin-diabetic rats. *Diabetologia* 37: 985-993, 1994.

- 24. Brindley, D. N.** Role of glucocorticoids and fatty acids in the impairment of lipid metabolism observed in the metabolic syndrome. *Int. J. Obes.* 19, Suppl. 1: S69–S75, 1995.
- 25. Brooks GA, Donovan CM.** Effect of endurance training on glucose kinetics during exercise. *Am J Physiol.* May; 244 (5):E505-12, 1983.
- 26. Bugianesi E, Kalhan S, Burkett E, Marchesini G, McCullough A.** Quantification of gluconeogenesis in cirrhosis: response to glucagon. *Gastroenterology*; 115: 1530-1540, 1998.
- 27. Buettner R, Ottinger I, Schölmerich J, and Bollheimer C.** Preserved direct hepatic insulin action in rats with diet-induced hepatic steatosis. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 286: E828-833, 2004.
- 28. Burcelin, R, Katz EB, and Charron MJ.** Molecular and cellular aspects of the glucagon receptor: role in diabetes and metabolism. *Diabetes Metab* 22: 373-396, 1996.
- 29. Burt AD, Mutton A, Day CP.** Diagnosis and interpretation of steatosis and steatohepatitis. *Semin Diagn Pathol.* Nov; 15 (4):246-58. Review, 1998.
- 30. Butler PC and Rizza RA.** Contribution to postprandial hyperglycemia and effect on initial splanchnic glucose clearance of hepatic glucose cycling in glucose intolerant or NIDDM patients. *Diabetes* 40: 73–81, 1991.
- 31. Campbell PT, Hnatowich M, O'Dowd BF, Caron MG, Lefkowitz RJ.** Mutations in the human β_2 -adrenergic receptor that impair coupling to GS interfere with receptor down-regulation but not sequestration. *Mol Pharmacol* 39:192-198, 1991.

- 32. Carel JC, Le Stunff C, Condamine L, Mallet E, Chaussain JL, Adnot P, Garabedian M, Bougneres P.** Resistance to the lipolytic action of epinephrine: a new feature of protein Gs deficiency. *J Clin Endocrinol Metab.* 1999 Nov; 84(11):4127-31.
- 33. Carstens, S, and Andersen I.** Intranasal glucagon in the treatment of hypoglycemia. A therapeutic possibility in the future. *Ugeskr Laeger* 156: 4339-4342, 1994.
- 34. Chang FH, Bourne HR.** Cholera toxin induces cAMP-independent degradation of Gs. *J Biol Chem.* Apr 5; 264(10):5352-7, 1989.
- 35. Charbonneau A, Couturier K, Gauthier MS, and Lavoie JM.** Evidence of hepatic glucagon resistance associated with hepatic steatosis: reversal effect of training. *Int J Sports Med.* Jul-Aug; 26(6):432-41, 2005.
- 36. Chastain MA.** The glucagonoma syndrome: a review of its features and discussion of new perspectives. *Am J Med Sci* 321: 306-320, 2001.
- 37. Chavin KD, Yang S, Lin HZ, Chatham J, Chacko VP, Hoek JB, Walajtys-Rode E, Rashid A, Chen CH, Huang CC, Wu TC, Lane MD, Diehl AM.** Obesity induces expression of uncoupling protein-2 in hepatocytes and promotes liver ATP depletion. *J Biol Chem.* Feb 26; 274 (9):5692-700, 1999.
- 39. Cherrington AD, Williams PE, Shulman GI, Lacy WW.** Differential time course of glucagon's effect on glycogenolysis and gluconeogenesis in the conscious dog. *Diabetes.* Mar; 30(3):180-7, 1981.
- 40. Cherrington AD, Chiasson JL, Liljenquist JE, Jennings AS, Keller U, Lacy WW.** The role of insulin and glucagon in the regulation of basal glucose production in the postabsorptive dog. *J Clin Invest.* 1976 Dec; 58(6):1407-18.

41. Chhibber VL, Soriano C, Tayek JA. Effects of low-dose and high-dose glucagon on glucose production and gluconeogenesis in humans. *Metabolism*. 2000 Jan; 49(1):39-46.

42. Chitturi S, Abeygunasekera S, Farrell GC, Holmes-Walker J, Hui JM, Fung C, Karim R, Lin R, Samarasinghe D, Liddle C, Weltman M, George J. NASH and insulin resistance: Insulin hypersecretion and specific association with the insulin resistance syndrome. *Hepatology*. 2002 Feb; 35(2):373-9.

43. Christophe, J. Glucagon and its receptor in various tissues. *Ann NY Acad Sci* 805: 31-43, 1996.

44. Christophe, J. Glucagon receptors: from genetic structure and expression to effector coupling and biological responses. *Biochim Biophys Acta* 1241: 45-57, 1995.

45. Ciudad, C, Camici M, Ahmad Z, Wang Y, DePaoli-Roach AA, and Roach PJ. Control of glycogen synthase phosphorylation in isolated rat hepatocytes by epinephrine, vasopressin and glucagon. *Eur J Biochem* 142: 511-520, 1984.

46. Consoli A. Role of liver in pathophysiology of NIDDM. *Diabetes Care* 15: 430-441, 1992.

47. Colbert LH, Davis JM, Essig DA, Ghaffar A, Mayer EP. Tissue expression and plasma concentrations of TNFalpha, IL-1beta, and IL-6 following treadmill exercise in mice. *Int J Sports Med*. May; 22 (4):261-7, 2001.

48. Crespo J, Cayon A, Fernandez-Gil P, Hernandez-Guerra M, Mayorga M, Dominguez-Diez A, Fernandez-Escalante JC, Pons-Romero F. Gene expression of tumor necrosis factor alpha and TNF-receptors, p55 and p75, in nonalcoholic steatohepatitis patients. *Hepatology*. Dec; 34(6):1158-63, 2001

49. **Cypess AM, Unson CG, Wu CR, Sakmar TP.** Two cytoplasmic loops of the glucagon receptor are required to elevate cAMP or intracellular calcium. *J Biol Chem*, Jul 2; 274 (27):19455-64, 1999.
50. **DeBurman SK, Ptasienski J, Benovic JL, and Hosey MM.** G protein-coupled receptor kinase GRK2 is a phospholipid-dependent enzyme that can be conditionally activated by G protein betagamma subunits. *J Biol Chem*, 271(37): p. 22552-62, 1996.
51. **DeFronzo RA, Sherwin RS, Kraemer N.** Effect of physical training on insulin action in obesity. *Diabetes* 36:1379-1385, 1987
52. **Dela F, Mikines KJ, von Linstow M, Secher NH, Galbo H.** Effect of training on insulin-mediated glucose uptake in human muscle. *Am J Physiol*. 1992 Dec; 263(6 Pt 1):E1134-43.
54. **Devlin JT.** Effects of exercise on insulin sensitivity in humans. *Diabetes Care*. 1992 Nov; 15(11):1690-3. Review.
54. **De Vries L, Zheng B, Fischer T, Elenko E, Farquhar MG.** The regulator of G protein signaling family. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*. 40:235-71, 2000.
55. **Dinneen S, Alzaid A, Turk D, and Rizza R.** Failure of glucagon suppression contributes to postprandial hyperglycaemia in IDDM. *Diabetologia* 38: 337-343, 1995.
56. **Dobbins, RL, Davis SN, Neal D, Caumo A, Cobelli C, and Cherrington AD.** Rates of glucagon activation and deactivation of hepatic glucose production in conscious dogs. *Metabolism* 47: 135-142, 1998.
57. **Doi, Y, Iwai M, Matsuura B, and Onji M.** Glucagon attenuates the action of insulin on glucose output in the liver of the Goto-Kakizaki rat perfused in situ. *Pflügers Arch* 442: 537-541, 2001.

58. **Dolph PJ, Ranganathan R, Colley NJ, Hardy RW, Socolich M, Zuker CS.** Arrestin function in inactivation of G protein-coupled receptor rhodopsin in vivo. *Science* 260:1910-1916, 1993.
59. **Donovan CM, Sumida KD.** Training enhanced hepatic gluconeogenesis: the importance for glucose homeostasis during exercise. *Med Sci Sports Exerc.* May;29(5):628-34. Review, 1997.
60. **Donovan CM, Sumida KD.** Training improves glucose homeostasis in rats during exercise via glucose production. *Am J Physiol.* Mar; 258(3 Pt 2):R770-6, 1997.
61. **Drouin R, Lavoie C, Bourque J, Ducros F, Poisson D, and Chiasson JL.** Increased hepatic glucose production response to glucagon in trained subjects. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 274: E23–E28, 1998.
62. **Drouin R, Robert G, Milot M, Massicotte D, Péronnet F, and Lavoie C.** Swim training increases glucose output from liver perfused in situ with glucagon in fed and fasted rats. *Metabolism* 53: 1027–1031, 2004.
63. **Ferguson SS, Caron MG.** G protein-coupled receptor adaptation mechanisms. *Semin Cell Dev Biol.* Apr;9(2):119-27. Review, 1998.
64. **Ferguson SSG, Downey WE III, Colapietro A-M, Barak LS, Menard L, Caron MG.** Role of β -arrestin in mediating agonist-promoted G protein-coupled receptor internalization. *Science* 271:363-366, 1996.
65. **Freissmuth M, Casey PJ, Gilman AG.** G proteins control diverse pathways of transmembrane signaling. *FASEB J.* Aug; 3(10):2125-31, 1998.

66. **Freychet, L, Rizkalla SW, Desplanque N, Basdevant A, Zirinis P, Tchobroutsky G, and Slama G.** Effect of intranasal glucagon on blood glucose levels in healthy subjects and hypoglycaemic patients with insulin-dependent diabetes. *Lancet* 1: 1364-1366, 1988.
67. **Friedman SL.** Molecular regulation of hepatic fibrosis, an integrated cellular response to tissue injury. *J Biol Chem.* Jan 28; 275(4):2247-50, 2000.
68. **Fromenty B, Robin MA, Igoudjil A, Mansouri A, Pessayre D.** The ins and outs of mitochondrial dysfunction in NASH. *Diabetes Metab.* 2004 Apr;30(2):121-38. Review.
69. **Fujimoto, T.** GPI-anchored proteins, glycosphingolipids, and sphingomyelin are sequestered to caveolae only after crosslinking *J. Histochem. Cytochem.*, 44: 929 – 941, 1996.
70. **Furuta, M, Yano H, Zhou A, Rouille Y, Holst JJ, Carroll R, Ravazzola M, Orci L, Furuta H, and Steiner DF.** Defective prohormone processing and altered pancreatic islet morphology in mice lacking active SPC2. *Proc Natl Acad Sci USA* 94: 6646-6651, 1997.
71. **Furuta, M, Zhou A, Webb G, Carroll R, Ravazzola M, Orci L, and Steiner DF.** Severe defect in proglucagon processing in islet A-cells of prohormone convertase 2 null mice. *J Biol Chem* 276: 27197-27202, 2001.
72. **Gelling RW, Du XQ, Dichmann DS, Romer J, Huang H, Cui L, Obici S, Tang B, Holst JJ, Fledelius C, Johansen PB, Rossetti L, Jelicks LA, Serup P, Nishimura E, Charron MJ.** Lower blood glucose, hyperglucagonemia, and pancreatic alpha cell hyperplasia in glucagon receptor knockout mice. *Proc Natl Acad Sci*, Feb 4; 100(3):1438-43. 2003.

- 73. Gainetdinov RR, Premont RT, Bohn LM, Lefkowitz RJ, Caron MG.** Desensitization of G protein-coupled receptors and neuronal functions. *Annu Rev Neuroscience*; 27:107-44, 2004.
- 74. Gauthier MS, Couturier K, Charbonneau A, Lavoie JM.** Effects of introducing physical training in the course of a 16-week high-fat diet regimen on hepatic steatosis, adipose tissue fat accumulation, and plasma lipid profile. *Int J Obes Relat Metab Disord*. Aug; 28(8):1064-71, 2004.
- 75. Gauthier MS, Couturier K, Latour JG, Lavoie JM.** Concurrent exercise prevents high-fat-diet-induced macrovesicular hepatic steatosis. *J Appl Physiol*. Jun; 94(6):2127-34, 2003.
- 76. Gettys TW, Ramkumar V, Surwit RS, Taylor IL.** Tissue-specific alterations in G protein expression in genetic versus diet-induced models of non-insulin-dependent diabetes mellitus in the mouse. *Metabolism*. Jun; 44(6):771-8, 1995.
- 77. Goodman OB Jr, Krupnick JG, Gurevich VV, Benovic JL, Keen, JH.** Arrestin-clathrin interaction: Localization of the arrestin binding locus to the clathrin terminal domain. *J Biol Chem* 272:15017-15022, 1997.
- 78. Goodyear LJ, Kahn BB.** Exercise, glucose transport, and insulin sensitivity. *Annu Rev Med*. 1998; 49:235-61. Review.
- 79. Griffin MJ, Sul HS.** Insulin regulation of fatty acid synthase gene transcription: roles of USF and SREBP-1c. *IUBMB Life*. 2004 Oct; 56(10):595-600. Review.
- 80. Gynzelberg F, Rennie MJ, Hickson RC, Holloszy JO.** Effect of training on the response of plasma glucagon to exercise. *J Appl Physiol*. Aug; 43(2):302-5, 1977.

- 81. Haga K, Kameyama K, Haga T, Kikkawa U, Shiozaki K, Uchiyama H.** Phosphorylation of human m1 muscarinic acetylcholine receptors by G protein-coupled receptor kinase 2 and protein kinase C. *J Biol Chem.* Feb 2; 271(5):2776-82, 1996.
- 82. Hansen LH, Gromada J, Bouchelouche P, Whitmore T, Jelinek L, Kindsvogel W, Nishimura E.** Glucagon-mediated Ca²⁺ signaling in BHK cells expressing cloned human glucagon receptors. *Am J Physiol*, Jun; 274(6 Pt 1):C1552-62, 1998.
- 83. Hansen, LH, Abrahamsen N, Hager J, Jelinek L, Kindsvogel W, Froguel P, and Nishimura E.** The Gly40Ser mutation in the human glucagon receptor gene associated with NIDDM results in a receptor with reduced sensitivity to glucagon. *Diabetes* 45: 725-730, 1996.
- 84. Hanson RW, Reshef L.** Regulation of phosphoenolpyruvate carboxykinase (GTP) gene expression. *Annu Rev Biochem* 66:581-611, 1997.
- 85. Hausdorff WP, Caron MG, Lefkowitz RJ.** Turning off the signal: desensitization of β -adrenergic receptor function. *FASEB J.* 4:2881-89. 1990.
- 86. Haymond, MW, and Schreiner B.** Mini-dose glucagon rescue for hypoglycemia in children with type 1 diabetes. *Diabetes Care* 24: 643-645, 2001.
- 87. Heled Y, Shapiro Y, Shani Y, Moran DS, Langzam L, Barash V, Sampson SR, Meyerovitch J.** Physical exercise enhances hepatic insulin signaling and inhibits phosphoenolpyruvate carboxykinase activity in diabetes-prone Psammomys obesus. *Metabolism.* Jul; 53(7):836-41, 2004.
- 88. Hendrick GK, Wasserman DH, Frizzell RT, Williams PE, Lacy DB, Jaspan JB, Cherrington AD.** Importance of basal glucagon in maintaining hepatic glucose production during a prolonged fast in conscious dogs. *Am J Physiol.* Sep; 263(3 Pt 1):E541-9, 1992.

89. Herzig, S, Long F, Jhala US, Hedrick S, Quinn R, Bauer A, Rudolph D, Schutz G, Yoon C, Puigserver P, Spiegelman B, and Montminy M. CREB regulates hepatic gluconeogenesis through the coactivator PGC-1. *Nature* 413: 179-183, 2001.
90. Hipkin RW, Wang Y, Schonbrunn A. Protein kinase C activation stimulates the phosphorylation and internalization of the sst2A somatostatin receptor. *J Biol Chem.* Feb 25; 275(8):5591-9, 2000.
91. Homburger V, Lucas M, Cantau B, Barabe J, Penit J, Bockaert J. Further evidence that desensitization of beta-adrenergic-sensitive adenylate cyclase proceeds in two steps. Modification of the coupling and loss of beta-adrenergic receptors. *J Biol Chem.* Nov 10; 255(21):10436-44, 1980.
92. Horton JD. Sterol regulatory element-binding proteins: transcriptional activators of lipid synthesis. *Biochem Soc Trans.* 2002 Nov; 30(Pt 6):1091-5. Review.
93. Houslay MD, Gawler DJ, Milligan G, Wilson A. Multiple defects occur in the guanine nucleotide regulatory protein system in liver plasma membranes of obese (fa/fa) but not lean (Fa/Fa) Zucker rats: loss of functional Gi and abnormal Gs function. *Cell Signal.* 1(1):9-22, 1989.
94. Huang CN, Lee KC, Wu HP, Tai TY, Lin BJ, and Chuang LM. Screening for the Gly40Ser mutation in the glucagon receptor gene among patients with type 2 diabetes or essential hypertension in Taiwan. *Pancreas* 18: 151–155, 1999.
95. Hundal RS, Krssak M, Dufour S, Laurent D, Lebon V, Chandramouli V, Inzucchi SE, Schummann WC, Petersen KF, Landau BR, and Shulman GI. Mechanism by which metformin reduces glucose production in type 2 diabetes. *Diabetes* 49: 2063–2069, 2000.

96. **Hvidberg, A, Djurup R, and Hilsted J.** Glucose recovery after intranasal glucagon during hypoglycaemia in man. *Eur J Clin Pharmacol* 46: 15-17, 1994.
97. **Iglesias MA, Ye J-M, Frangioudakis G, Saha AK, Tomas E, Ruderman NB, Cooney GJ, Kraegen EW .** AICAR administration causes an apparent enhancement of muscle and liver insulin action in insulin-resistant high-fat-fed rats. *Diabetes*; 51: 2886-2894, 2002.
98. **Ikeda, T, Hoshino T, Honda M, Takeuchi T, Mokuda O, Tominaga M, and Mashiba H.** Effect of glucagon on glucose output from bivascularly perfused rat liver. *Exp Clin Endocrinol* 94: 383-386, 1989.
99. **Iynedjian, PB, Auburger P, Guigoz Y, and Le Cam A.** Pretranslational regulation of tyrosine aminotransferase and phosphoenolpyruvate carboxykinase (GTP) synthesis by glucagon and dexamethasone in adult rat hepatocytes. *Biochem J* 225: 77-84, 1985.
100. **Jansson C, Harmala AS, Toivola DM, Slotte JP.** Effects of the phospholipid environment in the plasma membrane on receptor interaction with the adenylyl cyclase complex of intact cells. *Biochim Biophys Acta*. Feb 9; 1145(2):311-9, 1993.
101. **Jelinek, LJ, Lok S, Rosenberg GB, Smith RA, Grant FJ, Biggs S, Bensch PA, Kuijper JL, Sheppard PO, and Sprecher CA.** Expression cloning and signaling properties of the rat glucagon receptor. *Science* 259: 1614-1616, 1993.
102. **Jiang Y, Cypess AM, Muse ED, Wu CR, Unson CG, Merrifield RB, Sakmar TP.** Glucagon receptor activates extracellular signal-regulated protein kinase 1/2 via cAMP-dependent protein kinase. *Proc Natl Acad Sci U S A*, Aug 28; 98(18):10102-7, 2001.
103. **Jiang G, Zhang BB.** Glucagon and regulation of glucose metabolism. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. Apr;284(4):E671-8. Review, 2003.

- 104. Katyare SS, Howland JL.** Enhanced oxidative metabolism in liver mitochondria from genetically obese mice. *Arch Biochem Biophys*. May; 188(1):15-20, 1978.
- 105. Katz J, Tayek JA.** Gluconeogenesis and the Cori cycle in 12-, 20-, and 40-h-fasted humans. *Am J Physiol*. 1998 Sep; 275(3 Pt 1):E537-42.
- 106. Kitakoshi K, Oshida Y, Nakai N, Han YQ, Sato Y.** Effects of troglitazone and voluntary running on insulin resistance induced high fat diet in the rat. *Horm Metab Res*; 33: 365–369, 2001.
- 107. Krebs, EG.** Phosphorylation and dephosphorylation of glycogen phosphorylase: a prototype for reversible covalent enzyme modification. *Curr Top Cell Regul* 18: 401-419, 1981.
- 108. Krones A, Kietzmann T, and Jungermann K.** Periportal localization of glucagon receptor mRNA in rat liver and regulation of its expression by glucose and oxygen in hepatocyte cultures. *FEBS Lett*. 421(2): p. 136-40, 1998.
- 109. Kurland, IJ, and Pilkis SJ.** Covalent control of 6-phosphofructo-2-kinase/fructose-2,6-bisphosphatase: insights into autoregulation of a bifunctional enzyme. *Protein Sci* 4: 1023-1037, 1995.
- 110. Laporte SA, Oakley RH, Zhang J, et al.** The beta-2-adrenergic receptor/beta arrestin complex recruits the clathrin adaptor AP-2 during endocytosis. *Proc Natl Acad Sci USA* 1999 ; 96 : 3712-7, 1999.
- 111. Larsson H and Ahren B.** Islet dysfunction in insulin resistance involves impaired insulin secretion and increased glucagon secretion in postmenopausal women with impaired glucose tolerance. *Diabetes Care* 23: 650–657, 2000.

112. **Lavoie C, Ducros F, Bourque J, Langelier H, Chiasson JL.** Glucose metabolism during exercise in man: the role of insulin in the regulation of glucose utilization. *Can J Physiol Pharmacol.* Jan; 75(1):36-43, 1997.
113. **Lavoie C, Ducros F, Bourque J, Langelier H, Chiasson JL.** Glucose metabolism during exercise in man: the role of insulin and glucagon in the regulation of hepatic glucose production and gluconeogenesis. *Can J Physiol Pharmacol.* Jan; 75(1):26-35, 1997.
114. **Lefkowitz RJ, Shenoy SK.** Transduction of receptor signals by beta-arrestins. *Science.* Apr 22; 308(5721):512-7, 2005.
115. **Lefkowitz RJ.** Historical review: a brief history and personal retrospective of seven-transmembrane receptors. *Trends Pharmacol Sci.* Aug; 25(8):413-22, 2004.
116. **Lefkowitz RJ.** G protein-coupled receptor kinases. *Cell,* 74:409-412, 1993.
117. **Legare A, Drouin R, Milot M, Massicotte D, Peronnet F, Massicotte G, Lavoie C.** Increased density of glucagon receptors in liver from endurance-trained rats. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 2001 Jan; 280(1):E193-6.
118. **Lins, PE, Wajngot A, Adamson U, Vranic M, and Efendic S.** Minimal increases in glucagon levels enhance glucose production in man with partial hypoinsulinemia. *Diabetes* 32: 633-636, 1983.
119. **Link JT.** Pharmacological regulation of hepatic glucose production. *Curr Opin Investig Drugs.* 2003 Apr; 4(4):421-9. Review.
120. **Liu P, Anderson RG.** Compartmentalized production of ceramide at the cell surface. *J Biol Chem.* Nov 10; 270(45):27179-85, 1995.

- 121. Lohse MJ, Benovic JL, Caron MG, Lefkowitz RJ.** Multiple pathways of rapid beta 2-adrenergic receptor desensitization. Delineation with specific inhibitors. *J Biol Chem.* Feb 25; 265(6):3202-11, 1990.
- 122. Lopez-Illasaca M, Crespo P, Pellici PG, Gutkind JS, Wetzker R.** Linkage of G protein-coupled receptors to the MAPK signaling pathway through PI 3-kinase gamma. *Science*, Jan 17; 275(5298):394-7, 1997.
- 123. McFarlane-Anderson N, Bailly J, Begin-Heick N.** Levels of G-proteins in liver and brain of lean and obese (ob/ob) mice. *Biochem J.* Feb 15; 282 (Pt 1):15-23, 1992.
- 124. Machleidt T, Wiegmann K, Henkel T, Schutze S, Baeuerle P, Kronke M.** Sphingomyelinase activates proteolytic I kappa B-alpha degradation in a cell-free system. *J Biol Chem.* May 13; 269(19):13760-5, 1994.
- 125. MacNeil DJ, Occi JL, Hey PJ, Strader CD, Graziano MP.** Cloning and expression of a human glucagon receptor. *Biochem Biophys Res Commun.* Jan 14; 198(1):328-34. 1994.
- 126. Magnusson C, Vaux DL.** Signalling by CD95 and TNF receptors: not only life and death. *Immunol Cell Biol.* Feb; 77(1):41-6, 1999.
- 127. Malbon CC, Rapiejko PJ, Watkins DC.** Permissive hormone regulation of hormone-sensitive effector systems. *Trends Pharmacol Sci.* Jan; 9(1):33-6, 1988.
- 128. Marks, JS, and Botelho LH.** Synergistic inhibition of glucagon-induced effects on hepatic glucose metabolism in the presence of insulin and a cAMP antagonist. *J Biol Chem* 261: 15895-15899, 1986.

- 129. Matas Bonjorn V, Latour MG, Bélanger P, and Lavoie JM.** Influence of prior exercise and liver glycogen content on the sensitivity of the liver to glucagon. *J Appl Physiol* 92: 188–194, 2002.
- 130. Mayo, K. E., Miller, L. J., Bataille, D., Dalle, S., Göke, B., Thorens, B., and Drucker, D. J.** International Union of Pharmacology. XXXV. The Glucagon Receptor Family *Pharmacol Rev.* 55:167-194, 2003.
- 131. Medina J, Fernandez-Salazar LI, Garcia-Buey L, Moreno-Otero R.** Approach to the pathogenesis and treatment of nonalcoholic steatohepatitis. *Diabetes Care.* Aug; 27(8):2057-66, 2004.
- 132. Milligan G.** Guanine nucleotide-binding proteins and cellular control. *Curr Opin Cell Biol.* Apr; 1(2):196-200, 1989.
- 133. Milligan G, Unson CG.** Persistent activation of the alpha subunit of Gs promotes its removal from the plasma membrane. *Biochem J.* Jun 15; 260(3):837-41, 1989.
- 134. Mithieux G, Guignot L, Bordet JC, Wiernsperger N.** Intrahepatic mechanisms underlying the effect of metformin in decreasing basal glucose production in rats fed a high-fat diet. *Diabetes.* Jan; 51(1):139-43, 2002.
- 135. Mitrakou A, Kelley D, Veneman T, Jenssen T, Pangburn T, Reilly J, and Gerich J.** Contribution of abnormal muscle and liver glucose metabolism to postprandial hyperglycemia in NIDDM. *Diabetes* 39: 1381–1390, 1990.
- 136. Mochly-Rosen D.** Localization of protein kinases by anchoring proteins: a theme in signal transduction. *Science.* Apr 14; 268(5208):247-51. Review, 1995.

- 137. Moffett S, Adam L, Bonin H, Loisel TP, Bouvier M, Mouillac B.** Palmitoylated cysteine 341 modulates phosphorylation of the beta2-adrenergic receptor by the cAMP-dependent protein kinase. *J Biol Chem*, Aug 30; 271(35):21490-7, 1996.
- 138. Murphy GJ, Hraby VJ, Trivedi D, Wakelam MJ, Houslay MD.** The rapid desensitization of glucagon-stimulated adenylate cyclase is a cyclic AMP-independent process that can be mimicked by hormones which stimulate inositol phospholipid metabolism. *Biochem J*, Apr 1; 243(1):39-46, 1987.
- 139. Myers, SR, Diamond MP, Adkins-Marshall BA, Williams PE, Stinsen R, and Cherrington AD.** Effects of small changes in glucagon on glucose production during a euglycemic, hyperinsulinemic clamp. *Metabolism* 40: 66-71, 1991.
- 140. Narayan KA, McMullen JJ, Butler DP, Wakefield T, Calhoun WK.** Effect of exercise on tissue lipids and serum lipoproteins of rats fed two levels of fat. *J Nutr*; 105: 581-587, 1975.
- 141. Ng GY, Trogadis J, Stevens J, Bouvier M, O'Dowd BF, George SR.** Agonist-induced desensitization of dopamine D1 receptor-stimulated adenylyl cyclase activity is temporally and biochemically separated from D1 receptor internalization. *Proc Natl Acad Sci U S A*. Oct 24; 92(22):10157-61, 1995.
- 142. Nieto JL, Diaz-Laviada I, Guillen A, Haro A.** Effect of endurance physical training on rat liver adenylyl cyclase system. *Cell Signal*. Jun; 8(4):317-22, 1996.
- 143. Ohanian J, Ohanian V.** Sphingolipids in mammalian cell signalling. *Cell Mol Life Sci*. Dec; 58(14):2053-68, 2001.
- 144. Ohisalo JJ, Vikman HL, Ranta S, Houslay MD, Milligan G.** Adipocyte plasma-membrane Gi and Gs in insulinopenic diabetic patients. *Biochem J*. Nov 15; 264(1):289-92, 1989.

- 145. Okamoto T, Murayama Y, Hayashi Y, Inagaki M, Ogata E, Nishimoto I.** Identification of a Gs activator region of the beta 2-adrenergic receptor that is autoregulated via protein kinase A-dependent phosphorylation. *Cell*. Nov 15; 67(4):723-30, 1991.
- 146. Opara, EC, Atwater I, and Go VL.** Characterization and control of pulsatile secretion of insulin and glucagon. *Pancreas* 3: 484-487, 1988.
- 147. Oppermann M, Freedman NJ, Alexander RW, Lefkowitz RJ.** Phosphorylation of the type 1A angiotensin II receptor by G protein-coupled receptor kinases and protein kinase C. *J Biol Chem*. May 31; 271(22):13266-72, 1996.
- 148. Pagano G, Pacini G, Musso G, Gambino R, Mecca F, Depetris N, Cassader M, David E, Cavallo-Perin P, Rizzetto M.** Nonalcoholic steatohepatitis, insulin resistance, and metabolic syndrome: further evidence for an etiologic association. *Hepatology*. 2002 Feb; 35(2):367-72.
- 149. Paolisso, G, Scheen AJ, Albert A, and Lefebvre PJ.** Effects of pulsatile delivery of insulin and glucagon in humans. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 257: E686-E696, 1989.
- 150. Pappo I, Bercovier H, Berry E, Gallilly R, Feigin E, Freund HR.** Antitumor necrosis factor antibodies reduce hepatic steatosis during total parenteral nutrition and bowel rest in the rat. *JPEN J Parenter Enteral Nutr*. Jan-Feb; 19(1):80-2, 1995.
- 151. Parker, JC, Andrews KM, Allen MR, Stock JL, and McNeish JD.** Glycemic control in mice with targeted disruption of the glucagon receptor gene. *Biochem Biophys Res Commun* 290: 839-843, 2002.

- 152. Penn RB, Panettieri RA Jr, Benovic JL.** Mechanisms of acute desensitization of the beta2AR-adenylyl cyclase pathway in human airway smooth muscle. *Am J Respir Cell Mol Biol.* Aug; 19(2):338-48, 1998.
- 153. Pessayre D, Mansouri A, Fromenty B.** Nonalcoholic steatosis and steatohepatitis. V. Mitochondrial dysfunction in steatohepatitis. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.* Feb; 282(2):G193-9, 2002.
- 154. Petersen KF, Krssak M, Navarro V, Chandramouli V, Hundal R, Schumann WC, Landau BR, Shulman GI.** Contributions of net hepatic glycogenolysis and gluconeogenesis to glucose production in cirrhosis. *Am J Physiol.* 1999 Mar; 276(3 Pt 1):E529-35.
- 155. Petrides AS, De Fronzo RA.** Failure of glucagon to stimulate hepatic glycogenolysis in well-nourished patients with mild cirrhosis. *Metabolism.* 1994 Jan; 43(1):85-9.
- 156. Phillips SM, Han XX, Green HJ, Bonen A.** Increments in skeletal muscle GLUT-1 and GLUT-4 after endurance training in humans. *Am J Physiol.* 1996 Mar; 270(3 Pt 1):E456-62
- 157. Pilkis SJ and Granner DK.** Molecular physiology of the regulation of hepatic gluconeogenesis and glycolysis. *Annu Rev Physiol* 54: 885–909, 1992.
- 158. Pilkis, SJ, and Claus TH.** Hepatic gluconeogenesis/glycolysis: regulation and structure/function relationships of substrate cycle enzymes. *Annu Rev Nutr* 11: 465-515, 1991.
- 159. Pilkis, SJ, El-Maghrabi MR, McGrane M, Pilkis J, and Claus TH.** Regulation by glucagon of hepatic pyruvate kinase, 6-phosphofructo-1-kinase, and fructose-1,6-bisphosphatase. *Fed Proc* 41: 2623-2628, 1982

160. Pitcher JA, Fredericks ZL, Stone WC, Premont RT, Stoffel RH, Koch WJ, and Lefkowitz RJ. Phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate (PIP₂)-enhanced G protein-coupled receptor kinase (GRK) activity. Location, structure, and regulation of the PIP₂ binding site distinguishes the GRK subfamilies. *J Biol Chem*, 271(40): p. 24907-13, 1996.

161. Podolin DA, Wills BK, Wood IO, Lopez M, Mazzeo RS, Roth DA. Attenuation of age-related declines in glucagon-mediated signal transduction in rat liver by exercise training. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. Sep; 281(3):E516-23, 2001.

162. Podolin DA, Gleeson TT, Mazzeo RS. Hormonal regulation of hepatic gluconeogenesis: influence of age and training. *Am J Physiol*. Feb; 270 (2 Pt 2) :R365-72, 1996.

163. Podolin DA, Gleeson TT, Mazzeo RS. Role of norepinephrine in hepatic gluconeogenesis: evidence of aging and training effects. *Am J Physiol*. 1994 Nov; 267(5 Pt 1):E680-6, 1994.

164. Poortmans JR, Boisseau N. Biochimie des activités physiques. Collection : Sciences et pratiques du sport. 2ème édition, 2003, 488 pages

165. Portois L, Maget B, Tastenoy M, Perret J, and Svoboda M. Identification of a glucose response element in the promoter of the rat glucagon receptor gene. *J Biol Chem*. 274(12): p. 8181-90, 1999.

166. Post GR, Brown JH. G protein-coupled receptors and signaling pathways regulating growth responses. *FASEB J*. May; 10(7):741-9. Review, 1996.

167. Pryhuber GS, Huyck HL, Roper JM, Cornejo J, O'Reilly MA, Pierce RH, Tsitsikov EN. Acute tumor necrosis factor- α -induced liver injury in the absence of

tumor necrosis factor receptor-associated factor 1 gene expression. *Am J Pathol.* 2005 Jun; 166(6):1637-45.

168. Raab RM, Bullen J, Kelleher J, Mantzoros C, Stephanopoulos G. Regulation of mouse hepatic genes in response to diet induced obesity, insulin resistance and fasting induced weight reduction. *Nutr Metab (Lond).* Jun 28; 2:15, 2005.

169. Rao RH. Adaptations in glucose homeostasis during chronic nutritional deprivation in rats: hepatic resistance to both insulin and glucagon. *Metabolism*; 44: 817-82, 1995.

170. Roach, PJ. Control of glycogen synthase by hierarchal protein phosphorylation. *FASEB J* 4: 2961-2968, 1990.

171. Robert G, Drouin R, Milot M, Péronnet F, Massicotte D and Lavoie C. Effect of endurance training on epinephrine-induced hepatic glycogenolysis. *Can J Appl Physiol.* 26 : 506 (Abstract). 2001.

172. Rothfeld B, Levine A, Varady A, Loken S, Karmen A. The effect of exercise on lipid deposition in the rat. *Biochem Med* 1977; 18: 206–209, 1977.

173. Rothman DL, Magnusson I, Katz LD, Shulman RG, Shulman GI. Quantitation of hepatic glycogenolysis and gluconeogenesis in fasting humans with ¹³C NMR. *Science.* 1991 Oct 25; 254(5031):573-6.

174. Rouille, Y, Kantengwa S, Irminger J-C, and Halban PA. Role of the prohormone convertase PC3 in the processing of proglucagon to glucagon-like peptide 1. *J Biol Chem* 272: 32810-32816, 1997.

175. Rouille, Y, Bianchi M, Irminger J, and Halban P. Role of the prohormone convertase PC2 in the processing of proglucagon to glucagon. *FEBS Lett* 413: 119-123, 1997.

176. **Saltiel AR, Kahn CR.** Insulin signalling and the regulation of glucose and lipid metabolism. *Nature*; 414: 799-806, 2001.
177. **Samuel VT, Liu Z-X, Qu X, Elder BD, Bilz S, Belfroy D, Romanelli AJ, and Shulman GI.** Mechanism of hepatic insulin resistance in non-alcoholic fatty liver disease. *J Biol Chem* 279: 32345-32353, 2004.
178. **Shah P, Basu A, Basu R, and Rizza R.** Impact of lack of suppression of glucagon on glucose tolerance in humans. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 277: E283–E290, 1999.
179. **Shah P, Vella A, Basu A, Basu R, Schwenk WF, and Rizza RA.** Lack of suppression of glucagon contributes to postprandial hyperglycemia in subjects with type 2 diabetes mellitus. *J Clin Endocrinol Metab* 85: 4053–4059, 2000.
180. **Shapiro MJ, Trejo J, Zeng D, Coughlin SR.** Role of the thrombin receptor's cytoplasmic tail in intracellular trafficking. Distinct determinants for agonist-triggered versus tonic internalization and intracellular localization. *J Biol Chem.* Dec 20 ; 271(51):32874-80, 1996.
181. **Sherwin RS, Fisher M, Hendler R, and Felig P.** Hyperglucagonemia and blood glucose regulation in normal, obese and diabetic subjects. *N Engl J Med* 294: 455–461, 1976.
182. **Shiota D, Kasamatsu T, Dib SA, Chacra AR, and Moises RS.** Role of the Gly40Ser mutation in the glucagon receptor gene in Brazilian patients with type 2 diabetes mellitus. *Pancreas* 24: 386–390, 2002.
183. **Sibley DR, Peters JR, Nambi P, Caron MG, Lefkowitz RJ.** Desensitization of turkey erythrocyte adenylate cyclase. Beta-adrenergic receptor phosphorylation is

correlated with attenuation of adenylate cyclase activity. *J Biol Chem.* Aug 10; 259(15):9742-9, 1984.

184. Smotrys JE, Linder ME. Palmitoylation of intracellular signaling proteins: regulation and function. *Annu Rev Biochem*; 73: 559-87. Review, 2004.

185. Staddon JM, Hansford RG. Evidence indicating that the glucagon-induced increase in cytoplasmic free Ca^{2+} concentration in hepatocytes is mediated by an increase in cyclic AMP concentration. *Eur J Biochem*, Jan 15; 179(1):47-52, 1989.

186. Stallknecht B, Larsen JJ, Mikines KJ, Simonsen L, Bulow J, Galbo H. Effect of training on insulin sensitivity of glucose uptake and lipolysis in human adipose tissue. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 2000 Aug; 279(2):E376-85.

187. Stevenson RW, Steiner KE, Davis MA, Hendrick GK, Williams PE, Lacy WW, Brown L, Donahue P, Lacy DB, Cherrington AD. Similar dose responsiveness of hepatic glycogenolysis and gluconeogenesis to glucagon in vivo. *Diabetes.* Mar; 36(3):382-9, 1987.

188. Straczkowski M, Kowalska I, Dzienis-Straczowska S, Kinalski M, Gorski J, Kinalska I. The effect of exercise training on glucose tolerance and skeletal muscle triacylglycerol content in rats fed with a high-fat diet. *Diabetes Metab*; 27: 19-23, 2001.

189. Sumida KD, Donovan CM. Enhanced hepatic gluconeogenic capacity for selected precursors after endurance training. *J Appl Physiol.* Dec; 79(6):1883-8, 1995.

190. Sumida KD, Urdiales JH, Donovan CM. Enhanced gluconeogenesis from lactate in perfused livers after endurance training. *J Appl Physiol.* Feb; 74(2):782-7, 1993.

191. Svoboda M, Portois L, and Malaisse WJ. Glucose regulation of the expression of the glucagon receptor gene. *Mol Genet Metab.* 68(2): p. 258-67, 1999.

192. **Tamura Y, Tanaka Y, Sato F, Choi JB, Watada H, Niwa M, Kinoshita J, Ooka A, Kumashiro N, Igarashi Y, Kyogoku S, Maehara T, Kawasumi M, Hirose T, Kawamori R.** Effects of diet and exercise on muscle and liver intracellular lipid contents and insulin sensitivity in type 2 diabetic patients. *J Clin Endocrinol Metab.* Jun; 90(6):3191-6. Epub 2005 Mar 15, 2005.
193. **Tan, K, Tsiolakis D, and Marks V.** Effect of glucagon antibodies on plasma glucose, insulin and somatostatin in the fasting and fed rat. *Diabetologia* 28: 435-440, 1985.
194. **Tayek JA and Katz J.** Glucose production, recycling, and gluconeogenesis in normals and diabetics: a mass isotopomer [U-13C] glucose study. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 270: E709–E717, 1996.
195. **Terao T, Fujise T, Nakano S.** Effects of long-term exercise and high-cholesterol diet on lipid-lipoprotein metabolism in rats. *Tokai J Exp Clin Med*; 12: 243–251, 1987.
196. **Toft I, Gerich JE, and Jenssen T.** Autoregulation of endogenous glucose production during hyperglucagonemia. *Metabolism* 51: 1128–1134, 2002.
197. **Unger RH.** Glucagon physiology and pathophysiology in the light of new advances. *Diabetologia* 28: 574–578, 1985.
198. **Unger RH.** Role of glucagon in the pathogenesis of diabetes: the status of the controversy. *Metabolism* 27: 1691–1709, 1978.
199. **Unson CG.** Molecular determinants of glucagon receptor signaling. *Biopolymers*, 66(4):218-35, 2002.

- 200. Unson CG, Wu CR, Jiang Y, Yoo B, Cheung C, Sakmar TP, Merrifield RB.** Roles of specific extracellular domains of the glucagon receptor in ligand binding and signaling. *Biochemistry*. 2002 Oct 1; 41(39):11795-803, 2002.
- 201. von Zastrow M, Kobilka BK.** Ligand-regulated internalization and recycling of human beta 2-adrenergic receptors between the plasma membrane and endosomes containing transferrin receptors. *J Biol Chem*. 1992 Feb 15; 267(5):3530-8.
- 202. Wakelam MJ, Murphy GJ, Hraby VJ, Houslay MD.** Activation of two signal-transduction systems in hepatocytes by glucagon. *Nature*. Sep 4-10; 323(6083):68-71, 1986
- 203. Wasserman DH, Lickley HL, Vranic M.** Interactions between glucagon and other counterregulatory hormones during normoglycemic and hypoglycemic exercise in dogs. *J Clin Invest*. Oct; 74(4):1404-13, 1984.
- 204. Wasserman DH, Spalding JA, Lacy DB, Colburn CA, Goldstein RE, Cherrington AD.** Glucagon is a primary controller of hepatic glycogenolysis and gluconeogenesis during muscular work. *Am J Physiol*. Jul; 257(1 Pt 1):E108-17, 1989.
- 205. Wasserman DH, Spalding JA, Bracy D, Lacy DB, Cherrington AD.** Exercise-induced rise in glucagon and ketogenesis during prolonged muscular work. *Diabetes*. Jun; 38(6):799-807, 1989.
- 206. Wasserman DH, Cherrington AD.** Hepatic fuel metabolism during muscular work: role and regulation. *Am J Physiol*. Jun; 260(6 Pt 1):E811-24. Review, 1991.
- 207. Watkins DC, Northup JK, Malbon CC.** Regulation of G-proteins in differentiation. Altered ratio of alpha- to beta-subunits in 3T3-L1 cells. *J Biol Chem*. Aug5; 262(22):10651-7, 1987

- 208. Webb, GC, Akbar MS, Zhao C, Swift HH, and Steiner DF.** Glucagon replacement via micro-osmotic pump corrects hypoglycemia and alpha-cell hyperplasia in prohormone convertase 2 knockout mice. *Diabetes* 51: 398-405, 2002.
- 209. Weigle, DS, and Goodner CJ.** Evidence that the physiological pulse frequency of glucagon secretion optimizes glucose production by perfused rat hepatocytes. *Endocrinology* 118: 1606-1613, 1986.
- 210. Weigle, DS, Koerker DJ, and Goodner CJ.** Pulsatile glucagon delivery enhances glucose production by perfused rat hepatocytes. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 247: E564-E568, 1984.
- 211. Weinstein LS, Yu S, Warner DR, Liu J.** Endocrine manifestations of stimulatory G protein alpha-subunit mutations and the role of genomic imprinting. *Endocr Rev.* Oct; 22(5):675-705. Review, 2001.
- 212. Wiegmann K, Schutze S, Machleidt T, Witte D, Kronke M.** Functional dichotomy of neutral and acidic sphingomyelinases in tumor necrosis factor signaling. *Cell.* Sep 23; 78(6):1005-15, 1994.
- 213. Wigg AJ, Roberts-Thomson IC, Dymock RB, McCarthy PJ, Grose RH, Cummins AG.** The role of small intestinal bacterial overgrowth, intestinal permeability, endotoxaemia, and tumour necrosis factor alpha in the pathogenesis of non-alcoholic steatohepatitis. *Gut.* Feb; 48(2):206-11, 2001
- 214. Winder WW, Hagberg JM, Hickson RC, Ehsani AA, McLane JA.** Time course of sympathoadrenal adaptation to endurance exercise training in man. *J Appl Physiol.* Sep; 45(3):370-4, 1978.

- 215. Wolfrum C, Asilmaz E, Luca E, Friedman JM, Stoffel M.** Foxa2 regulates lipid metabolism and ketogenesis in the liver during fasting and in diabetes. *Nature*. 2004 Dec 23; 432(7020):1027-32.
- 216. Yoon, JC, Puigserver P, Chen G, Donovan J, Wu Z, Rhee J, Adelmant G, Stafford J, Kahn CR, Granner DK, Newgard CB, and Spiegelman BM.** Control of hepatic gluconeogenesis through the transcriptional coactivator PGC-1. *Nature* 413: 131-138, 2001.
- 217. Young, AA, Cooper GJ, Carlo P, Rink TJ, and Wang MW.** Response to intravenous injections of amylin and glucagon in fasted, fed, and hypoglycemic rats. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 264: E943-E950, 1993.
- 218. Zhang J, Ferguson SSG, Barak LS, Menard L, Caron MG.** Dynamin and b-arrestin reveal distinct mechanisms for G protein-coupled receptor internalization. *J Biol Chem* 271:18302-18305, 1996.
- 219. Zhang M, Turnbaugh D, Cofie D, Dogan S, Koshida H, Fugate R, Kem DC.** Protein kinase C modulation of cardiomyocyte angiotensin II and vasopressin receptor desensitization. *Hypertension*. Feb; 27(2):269-75, 1996.
- 220. Moxham CM, Malbon CC.** Insulin action impaired by deficiency of the G-protein subunit G i α 2. *Nature*. Feb 29; 379(6568): 840-4, 1996.

Appendice 2
RÉSUMÉ D'ARTICLES EN TANT QUE CO-AUTEURS

Gauthier MS, Couturier K, **Charbonneau A**, Lavoie JM. Effects of introducing physical training in the course of a 16-week high-fat diet regimen on hepatic steatosis, adipose tissue fat accumulation, and plasma lipid profile. *Int J Obes Relat Metab Disord*. 2004, 28(8):1064-71.

OBJECTIVE: We recently reported that an 8-week high-fat diet-induced hepatic steatosis was completely prevented if an exercise training programme was introduced and pursued concurrently with the diet. The purpose of the present study was to determine the extent to which introducing exercise training at mid-point in the course of a 16-week high-fat diet regimen contributes to the reversal of liver lipid infiltration and the reduction of blood lipid profile deterioration and body fat accumulation. **DESIGN AND SUBJECTS:** Two groups of rats were fed a high-fat diet (42% kcal) for 16 weeks, one remaining sedentary during this entire period (HF-Sed) and the other being exercise trained for the last 8 weeks (HF-Tr). A third group was fed a standard diet and remained sedentary for all 16 weeks (SD-Sed). Training (5 days/week for 8 weeks) began 8 weeks after introducing the high-fat diet and consisted of treadmill running that was progressively increased to reach 60 min at 26 m/min, 10% grade, for the last 4 weeks. **MEASUREMENTS:** Various parameters including liver lipid infiltration, fat depots and blood lipids. **RESULTS:** Unexpectedly, liver lipid infiltration was not significantly higher in HF-Sed than in SD-Sed rats (means \pm s.e.: 14.9 \pm 1.7 vs 12.3 \pm 0.4 mg/g; $P>0.05$). High-fat compared to age-matched standard fed rats also showed an absence of difference ($P>0.05$) in the weight of total visceral fat pads (13%), plasma nonesterified fatty acids (NEFA), and leptin concentrations, but depicted significantly ($P<0.01$) higher values for subcutaneous fat pad weight and plasma triacylglycerol. Exercise training largely decreased visceral and subcutaneous fat accumulation by 30 and 26%, respectively ($P<0.01$) as well as NEFA, triacylglycerol, and leptin concentrations ($P<0.01$). **CONCLUSION:** Liver lipid infiltration does not seem to progress linearly over 16 weeks of high-fat feeding in light of what has previously been observed after 8 weeks of high-fat feeding. Introducing a training programme in the course of a 16-week high-fat diet protocol reduced adiposity, plasma NEFA, and leptin concentrations below the levels observed in standard fed rats. These data indicate that, exercise training, whether conducted concurrently or introduced during the course of a high-fat diet, is an asset to reduce the deleterious effects of a high-fat diet.

Yasari S, Paquette A, **Charbonneau A**, Gauthier MS, Savard R, Lavoie JM. Effects of exercise training cessation combined to the initiation of high-fat diet regimen in rats.

OBJECTIVE : The purpose of the present study was to determine if exercise trained rats may benefit from a metabolic protection in response to an obesity stimulus initiated upon training cessation. **DESIGN AND SUBJECTS :** Two groups of female rats were, first, either treadmill trained for 8 wk or remained sedentary (Sed). Previously trained (DTr) and Sed rats were, thereafter, submitted either to a high-fat (HF; 42% kcal) or kept on a standard diet (SD) for another 6 wk while remaining sedentary. **RESULTS :** Immediately after the training period ($T = 0$), DTr rats exhibited similar body weight and higher dietary intake but smaller body fat content (4 fat pads) compared to Sed rats. DTr rats, under both diets, exhibited higher gain in body fat than Sed rats (DTr vs Sed: 71 vs 8% and 132 vs 55% in SD and HF respectively) such that fat accretion in all 4 depots was similar to Sed rats 6 wk after training cessation. Despite higher adipocyte fat accretion, liver lipid infiltration was completely prevented in DTr animals ($T = 2$ wk under HF diet) and plasma FFA levels were lower throughout the detraining period. In addition, plasma leptin levels remained lower in DTr animals throughout the detraining period under the HF diet condition. **CONCLUSION :** In spite of an enhanced susceptibility to adipocyte fat accumulation in DTr rats on an HF diet, DTr rats still benefit from some metabolic protection against overwhelming accumulation of lipids in extra-adipocyte compartments.

Appendice 2
RÉSUMÉ DES PRÉSENTATION À DES CONGRÈS
INTERNATIONAUX

EVIDENCE OF INDUCED HEPATIC GLUCAGON RESISTANCE IN HIGH-FAT FED RATS : REVERSAL EFFECTS OF TRAINING

Charbonneau, A., Couturier, K., Gauthier, M.-S., and Lavoie, JM. : University of Montreal,

FASEB – SAN DIEGO 2002

The present study was undertaken to test the hypotheses that 1) a high-fat diet-induced hepatic steatosis modifies hepatic glucose production (HGP) in response to a hyperglucagonemic state and 2) that training enhances hepatic glucagon sensitivity. HGP ($[3\text{-}^3\text{H}]\text{glucose}$) was measured in four groups of anesthetized rats infused with glucagon (2 ug/kg/min iv) over a period of 60 min. Two of these groups were normally fed (ST) and two other groups were fed a high-fat diet (HF; 40%) for eight weeks. Each dietary group was subdivided into a six-week trained (TR-60 min of running $15\text{-}26\text{ m/min}$, 10% slope) and a sedentary (SE) group. Plasma glucagon ($\sim 100\text{ 000 pg/ml}$) and insulin ($\sim 600\text{ pmol/l}$) levels were increased similarly in all four groups. Glucagon induced-hyperglycemia was higher ($P < 0,05$) in the ST-SE group than in all other groups. Hyperglucagonemia had a triglyceride lowering effect: while plasma triglycerides were reduced significantly, plasma glycerol increased ($P < 0,05$). Although free fatty acids increased physiologically in all groups, It was not all statistically significant. The main findings of this study are 1) HGP is reduced with the feeding of a high fat diet with a hyperglucagonemic clamp ($P < 0,05$) and 2) that training partially enhance hepatic sensitivity to glucagon in steatohepatitis with a hyperglucagonemic clamp. The decreased hepatic glucose production was significantly correlated with the amount of hepatic triglycerides ($r^2 = 0,721$, $P < 0,05$). It is concluded that hepatic lipids plays a role in the sensitivity of the liver to glucagon.

ALTERATIONS IN HEPATIC GLUCAGON RECEPTOR, G_{sa} AND G_{ia2} , FUNCTION WITH HEPATIC LIPID INFILTRATION: EFFECTS OF ACUTE EXERCISE

Charbonneau, A., Melancon, A., Lavoie, C. and Lavoie, JM. : University of Montreal,

NAASO – LAS VEGAS 2004

The present study was undertaken to test the hypothesis that a high-fat diet-induced liver lipid infiltration is associated with a reduction of hepatic glucagon receptor density (B_{max}), affinity (K_d) and stimulatory G-protein (G_{sa}) expression while enhancing inhibitory G-protein (G_{ia2}) expression. We also hypothesized that a single bout of endurance exercise would re-establish hepatic glucagon receptor response while restoring G protein expression to standard levels. B_{max} , K_d , G_{sa} , G_{ia2} were measured on hepatic plasma membrane in four different groups of rats. Two of these groups were fed a standard diet (ST) while the two other groups were fed a high-fat diet (HF; 40% kcal) for two weeks. Each dietary group was subdivided into an exercised group (Ex) that was submitted to a single bout of endurance exercise on a treadmill (30 minutes, 26 m/min, 0% slope) and a non-exercised (N-Ex) group. Hepatic glycogen concentrations were lower in the HF-fed groups in both sedentary and exercised rats ($P < 0,05$). As for hepatic triglyceride concentrations, they were significantly higher (50%) in both HF-fed groups ($P < 0,05$). B_{max} was reduced with high fat feeding ($P < 0,05$) in both sedentary and exercised state while K_d was significantly higher in the high-fat fed group compared to the standard group ($P < 0,05$). Comparisons of all individual liver triglyceride and B_{max} values revealed that hepatic triglyceride values were associated with the decrease of glucagon receptor number ($P < 0.05$, $R = -0.798$). Interestingly, G_{sa} expression was significantly reduced with liver lipid infiltration while G_{ia2} expression increased ($P < 0,05$). The present results indicate that the high-fat feeding reduces hepatic glucagon functions which is partially reverse by acute exercise. It is suggested that liver lipid infiltration may interfere with the action of glucagon receptors.